UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DES ^{86}RUBIDIUMEFFLUXES LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE DURCH THIOLE UND THIOLOXIDANTIEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MARTIN A. WAHL
aus Stuttgart

~~1984~~
1983

UNIV.
LIBRARY
NOT.

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DES ^{86} RUBIDIUMEFFLUXES LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE DURCH THIOLE UND THIOLOXIDANTIEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MARTIN A. WAHL
aus Stuttgart

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1981 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1983 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. med. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Michael Mark danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Versuchen zur Methodik.

Den Mitarbeitern des Isotopenlabors der Universität Tübingen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei technischen Fragen.

Des weiteren gilt mein herzlicher Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Barbara

und meinen Eltern

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0001

Abkürzungen

cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
BSA	bovine serum albumin
pCMB	para-Chlormercuribenzoat
pCMBS	para-Chlormercuribenzolsulfonsäure
CPDS	Bis-(5-carboxy-2-pyridyl)disulfid
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIP-Salz	Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methyl-piperazid)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
ε	molarer Extinktionskoeffizient
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
IRI	Immunreaktives Insulin
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
Mean	arithmetisches Mittel
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form
PPS	Pentosephosphatshunt
RIA	radioimmunoassay
SEM	standard error of the mean
U	units (Einheiten beim RIA)

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Übersicht über den Insulinsekretions-mechanismus	2
1.1.2	Vermittlung des Reizsignales an den Sekretionsmechanismus	3
1.1.3	Rolle der Glycolyse bei der Insulin-sekretion	4
1.1.4	Rolle des Pentosephosphatshunt	5
1.1.5	Die Rolle der Thiole bei der Insulinsekretion	7
1.1.6	Bedeutung der Ionen für die Insulinsekretion	11
1.1.6.1	Rolle des Calciums	11
1.1.6.2	Rolle des Kaliums bei der Insulinsekretion	16
1.1.7	Rolle der elektrischen Aktivität der Zelle	27
1.2	Fragestellung	31
1.2.1	Methodische Fragestellung	31
1.2.2	Wissenschaftliche Fragestellung	31
2	Material	34
2.1	Verwendete Tiere	34
2.2	Geräte	34
2.3	Chemikalien	35
2.3.1	Bezogene Chemikalien	35
2.3.2	Eigensynthetisierte Chemikalien	35
2.3.3	Reinigung des Rinderserumalbumins zur Perifusion	40

2.4	Verwendete Lösungen	40
2.4.1	Hanks-Lösung	40
2.4.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer	41
2.4.3	HEPES-Puffer	43
2.5	Inkubationsmedien für die Versuche im statischen System	44
2.5.1	Medium für die Präparation der Inseln	44
2.5.2	Medium für die Vorinkubation	44
2.5.3	Medien für die Hauptinkubation	44
2.5.3.1	Radioaktivitätszugabe	45
2.5.4	Waschmedien	45
2.5.5	Effluxmedien für die Versuche im statischen System	46
2.6	Medium für die Versuche im dynamischen System	46
2.6.1	Effluxmedium für die Perifusion	46
2.7	Gefäße für die Inkubationsversuche	47
3	Methode	54
3.1	Methoden anderer Arbeitsgruppen	54
3.1.1	Methoden zur Bestimmung der Kaliumaufnahme	54
3.1.2	Methoden zur Bestimmung des Kaliumeffluxes	55
3.2	Auswahlkriterien	57
3.3	Versuchsablauf	58
3.3.1	Isolierung der Langerhansschen Inseln für die Versuche im statischen System	58
3.3.1.1	Inselisolierung für die Perifusion	59
3.3.2	Vorinkubation	60
3.3.3	Hauptinkubation	61

3.3.4	Waschvorgang	62
3.3.5	Messung des Rubidiumgehaltes	62
3.3.6	Auswertung der Messergebnisse	63
3.3.7	Bestimmung der Effluxrate im statischen System	63
3.4	Perifusion von Inseln	64
3.4.1	Berechnung der Effluxrate	68
3.4.2	Auswertung der Effekte	69
3.4.3	Durchführung der Berechnungen	70
3.5	Insulinbestimmung im statischen System	71
3.5.1	Durchführung der Bestimmung	71
3.5.2	Berechnung der Insulinmenge	72
3.5.3	Insulinbestimmung in der Perifusion	73
4	Ergebnisse des methodischen Teiles	74
4.1	Bestimmung von ^{86}Rubidium im ß-Szintillationszähler	74
4.1.1	Bestimmung des günstigsten Energiebereiches für die Messung von ^{86}Rubidium	74
4.1.2	Bestimmung des Quencheffektes	75
4.1.3	Bestimmung von Leerwerten zur Backgroundstandardisierung	76
4.1.4	Bestimmung der Verlustrate beim Dekantieren	76
4.1.5	Leernetzinkubation	77
4.2	Erstellen einer Aufnahmekurve	78
4.2.1	Aufnahmeversuch I	78
4.2.2	Versuch zur Verbesserung des Waschverfahrens	80
4.2.3	Aufnahmeversuch II	85

4.2.4	Bestimmung der Insulinsekretion in albuminfreiem Medium	87
4.2.5	Aufnahmeversuch II	91
4.2.6	Untersuchung der Überlebensfähigkeit der Insel in albuminfreiem oder dextranhaltigem Medium	93
4.2.7	pH- und Wartebankkontrolle	95
4.2.8	Aufnahmeversuch IV	99
4.3	Bestimmung der Rubidiumeffluxrate	102
4.3.1	Effluxmessung nach der Außenmediummethode	102
4.3.1.1	Vorversuch I	102
4.3.1.2	Bestimmung der Rubidiumadsorption an Styrolrohren	104
4.3.1.3	Versuch zur Verbesserung der Inselauflösung	105
4.3.1.4	Vorversuch II	106
4.3.1.5	Einfluß der Glucosekonzentration auf den Rubidiumefflux	109
4.3.1.6	Messung des Rubidiumeffluxes zu einem späteren Zeitpunkt	111
4.4	Perifusion	112
4.4.1	Effluxhemmung durch Glucose	112
4.4.2	Untersuchung der Wirkung von Tolbutamid	114
4.4.3	Untersuchung der Störwirkung von exokrinem Pankreasgewebe bei Rubidiumeffluxmessungen	116
4.4.4	Bestimmung der Insulinsekretion in der Perifusion	120
5	Versuchsergebnisse	121
5.1	Versuchsplanung	121
5.2	Erstellung der Vergleichskurven	121

5.3	Untersuchung des Einflusses von DIP und DIP-Salz auf den Rubidiumefflux isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte	129
5.3.1	Wirkung von DIP auf den Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln der Ratte	129
5.3.2	Wirkung von DIP-Salz auf den Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln der Ratte	136
5.4	Untersuchung der Wirkung von reduziertem Glutathion (GSH) auf den Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln der Ratte	143
5.5	Auswertung der Versuchsergebnisse	146
5.5.1	Versuche mit DIP	147
5.5.2	Versuche mit DIP-Salz	148
6	Diskussion	150
6.1	Bedeutung des Kaliums	150
6.2	Versuche zur Messung des Rubidiumeffluxes	151
6.2.1	Beladung der Inseln mit radioaktivem ^{86}Rubidium	151
6.2.2	Messung des Rubidiumeffluxes	154
6.3	Thiolabhängigkeit des Rubidiumeffluxes	157
6.3.1	Stellung der Kaliumpermeabilität in der Sekretionskaskade	157
6.3.2	Einfluß der Thiole auf die Sekretionskaskade	158
6.3.2.1	Oxidation intrazellulärer Thiole mit DIP	158
6.3.2.2	Oxidation extrazellulärer Thiole mit DIP-Salz	160
6.3.2.3	Einfluß von exogen zugesetztem reduziertem Glutathion auf den Rubidiumefflux	161
6.4	Einordnung der Rolle der Thiole und des Rubidiumeffluxes in die Sekretionskaskade	163

6.5	Zusammenfassung	166
6.5.1	Fragestellung	166
6.5.2	Ergebnisse des methodischen Teiles	166
6.5.3	Versuchsergebnisse	167
6.5.4	Schlußfolgerungen	168
7	Literatur	169
8	Anhang	187
8.1	Programm zur Berechnung der Rubidiumaufnahme	187
8.2	Programm zur Berechnung der Effluxrate bei Perifusionen	189
8.3	Programm zur Auswertung der Perifusionen	195

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Übersicht über den Insulinsekretionsmechanismus

Die Freisetzung von Insulin durch die ß-Zelle der Langerhansschen Insel geschieht in der Regel durch einen Glucosereiz in Höhe von mindestens 5 mM (Ashcroft et al., 1973). Dabei wird angenommen, daß durch die Metabolisierung der Glucose die Konzentration einer Schlüsselsubstanz ansteigt und hierdurch der Sekretionsmechanismus in Gang gesetzt wird (Ashcroft, 1979). Fest steht, daß durch den Glucosemetabolismus eine Zunahme der cytosolischen Calciumkonzentration (Malaisse, 1973) durch Veränderung der Membranpermeabilität verursacht wird (Ribalet und Beigelman, 1980). Die zweite Möglichkeit zur Steigerung der Calciumkonzentration im Cytoplasma beruht auf der Stimulation der Adenylatcyclase (Grill und Cerasi, 1975), unter Umständen über einen membranständigen Rezeptor, und somit einem Ansteigen des cAMP-Gehaltes der Insel (Kuo et al., 1973). Dadurch wird Calcium aus Zellorganellen und dem mitochondrialen Calciumpool freigesetzt (Brisson et al., 1972). Das nun in freier Form im Intrazellulärraum vorliegende Calcium bildet unter Zusammentritt mit Calmodulin, einem Regulatorprotein, dessen aktive Form, das Calciumcalmodulin (Tomlinson et al., 1982). Durch das Calciumcalmodulin wird einerseits eine Myosinkinase aktiviert (Yagi et al., 1978), andererseits ein Einfluß auf die Polymerisation von Tubulin ausgeübt (Marcum et

al., 1978). Die Myosinkinase katalysiert die Verbindung von Myosin mit Aktin und damit die Bildung von Microfilamenten, die sich unter Hinzutritt von ATP kontrahieren können. Das polymerisierte Tubulin seinerseits bildet ein sogenanntes Microtubulussystem. Für die Exocytose des in Granula gespeicherten Insulins wird nun eine durch die Microfilamentkontraktion vermittelte Bewegung über die Microtubuli postuliert (Howell und Tyhurst, 1982). Dieses Prinzip wird in der Abbildung 1-1 zusammengefaßt.

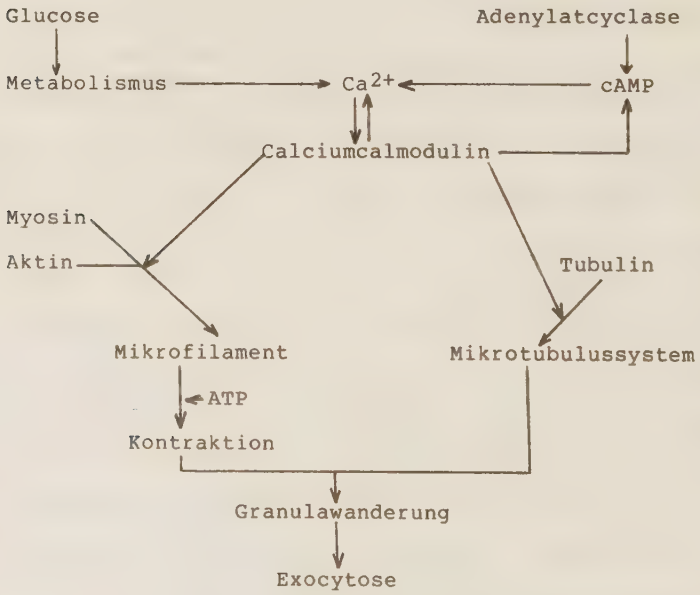


Abb.1-1: Übersicht über den Ablauf des Insulinfreisetzungsmechanismus nach Howell und Tyhurst (1982)

1.1.2 Vermittlung des Reizsignales an den Sekretionsmechanismus

Der zentrale Punkt für die Auslösung der Sekretion ist die Erhöhung der Calciumaufnahme in das Cytoplasma. Für die Vermittlung dieser Steigerung nach einem Glucosereiz wird folgender Mechanismus diskutiert:

Die Glucose wird in der Zelle durch die Glycolyse und durch den Pentosephosphatshunt abgebaut. Dabei vermindert das bei der Glycolyse entstehende Phosphoenolpyruvat die Calciumaufnahme durch die Mitochondrien, eventuell durch Aktivierung der Adenylatcyclase, und erhöht somit die Konzentration an freiem Calcium im Cytoplasma (Sugden und Ashcroft, 1978). Gleichzeitig wird über den Pentosephosphatshunt der NADPH/NADP-Quotient durch Bildung von NADPH erhöht (Ammon et al., 1976, 1983; Verspohl et al., 1979). Der Anstieg dieses Quotienten vermittelt nun seinerseits eine Hemmung des Kaliumeffluxes (Henquin, 1980) und verursacht ein Aktionspotential durch partielle Depolarisierung der Zellmembran. Diese wird dadurch für Calciumionen durchlässig, was zu einem massiven Einstrom entlang einem Konzentrationsgefälle in die Zelle und zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma führt (Ashcroft, 1979). Dieser Mechanismus ist in Abbildung 1-2 zusammengefaßt.

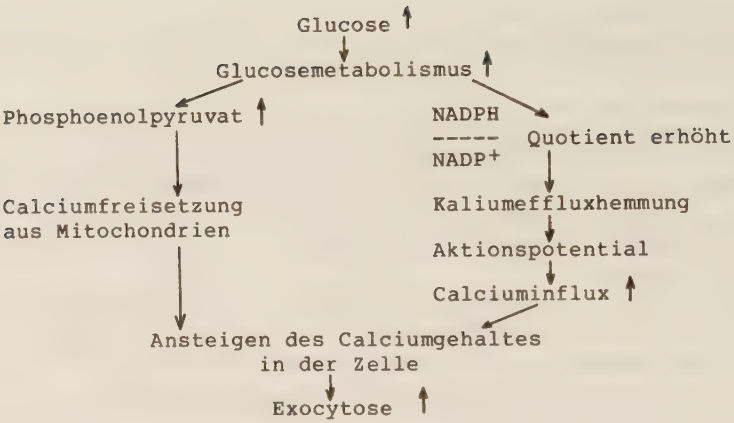


Abb. 1-2: Schema der Vermittlung der Calciumaufnahmesteigerung nach Glucosereiz (Ashcroft, 1979)

1.1.3 Rolle der Glycolyse bei der Insulinsekretion

Der hauptsächliche Abbauweg für die Glucose in der Zelle ist die Glycolyse. In der Langerhansschen Insel werden nur etwa 2 % - 4 % der verbrauchten Glucose über den Pentosephosphatshunt abgebaut, der Rest jedoch über die Glycolyse (Ashcroft et al., 1972 b). Dabei hat sich bei der Langerhansschen Insel gezeigt, daß ein enger Zusammenhang zwischen dem Abbau von Zuckern und der durch sie ausgelösten Insulinsekretion besteht. So konnten Ashcroft et al. (1972 b, 1973) zeigen, daß für die Insulinsekretion eine initiale Glucosekonzentration von 5 mM notwendig ist. Eine Steigerung der Insulinsekretion durch Steigerung der Glucosekonzentration im Medium verläuft bis zu einer Konzentration von 20 mM Glucose sigmoid. Bei dieser Konzentration ist ein Sekretionsmaximum erreicht. Die K_m beträgt 8 mM. Der limitierende Faktor für

die Metabolisierung der Glucose ist die Umwandlung zu Glucose-6-Phosphat (Ashcroft und Randle, 1970; Hedeskov und Capito, 1974). Der enge Zusammenhang zwischen Glucoseutilisation einerseits und der Insulinsekretion auf der anderen Seite konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Ashcroft et al., 1970 b). Dagegen zeigte sich, daß Zucker, die durch die Glycolyse nur schlecht abgebaut werden können, wie zum Beispiel Galaktose oder 3-O-Methylglucose, nicht zu einer Steigerung der Insulinsekretion in der Lage sind (Zawalich et al., 1977). Für Mannoheptulose wurde gezeigt, daß sie sowohl die Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-phosphat als auch die durch Glucose induzierte Insulinsekretion hemmt (Malaisse et al., 1968). Jodacetat, ein Glycolyseinhibitor, hemmt ebenfalls die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Zawalich et al., 1977). Wird die Insulinsekretion jedoch durch D-Glycerinaldehyd stimuliert, so kann dieser Effekt, wie auch zu erwarten ist, nicht durch Mannoheptulose gehemmt werden (Ashcroft et al., 1973).

1.1.4 Rolle des Pentosephosphatshunts

Um die Rolle des Pentosephophatshunts für die Steuerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion zu klären, mußte zunächst die Frage untersucht werden, ob bei einer Steigerung der extrazellulären Glucosekonzentration der Abbau von Glucose im Pentosephosphatshunt ebenfalls gesteigert ist. Snyder et al. (1970) und Ashcroft et al. (1972) konnten zwar eine analog zur Glucosekonzentrationssteigerung von 3 mM bis 16,7 mM gesteigerte Insulinse-

kretion messen, nicht jedoch die zu erwartende Steigerung des Glucosedurchsatzes durch den Pentosephosphatshunt. Dieser Befund stellte die Rolle des Pentosephosphatshunts in Frage. Panten et al. (1973) zeigten jedoch, daß bei einer Steigerung der extrazellulären Glucosekonzentration von 5 mM auf 20 mM ein Ansteigen der NADPH-Fluoreszenz zu beobachten ist. Diese Fluoreszenzsteigerung konnte durch Mannose ebenfalls erzeugt werden, trat jedoch bei Gabe von Mannoheptulose nicht auf. Auch bei Gabe von D-Glycerinaldehyd war bei Ratteninseln eine Steigerung der Fluoreszenz und somit des Gehaltes an reduzierten Pyridinnukleotiden zu beobachten, nicht jedoch bei Inseln von diabetischen ob/ob Mäusen (Panten et al., 1976). Ammon et al. (1973) fanden, daß bei einer Hemmung der Bildung von aktivem NADPH aus dem Pentosephosphatshunt mittels 6-Aminonikotinamid die Insulinsekretion vermindert war. Auch konnte die Insulinsekretion durch Oxidation von NADPH durch Methylenblau gehemmt werden (Ammon et al. 1977). Henquin (1978) konnte zeigen, daß die Hemmung des Kaliumeffluxes und damit die Entstehung eines Aktionspotentiales mit einer Steigerung des NADH- und NADPH-Gehaltes, das heißt einer Vergrößerung des NADPH/NADP-Quotienten, einhergeht. Da das NADPH im Pentosephosphatshunt entsteht, müßte nach dem Ansteigen dieses Produktes bei Glucosestimulation und der stattfindenden glucoseinduzierten Insulinsekretion auch ein verstärkter Substratdurchfluß durch den Pentosephosphatshunt zu beobachten sein. Verspohl et al. (1979) fanden den Grund für die Diskrepanz zu den Befunden von Snyder et al. (1970). Sie konnten durch Versuche mit von außen zugesetztem Insulin zeigen, daß durch das exogene Insulin, und somit sicher

auch durch das von den Inseln freigesetzte Insulin, der Pentosephosphatshunt durch eine Art Feedbackmechanismus gehemmt wurde. Gleichzeitig wurde durch exogenes Insulin der NADPH/NADP-Quotient gesenkt und die glucosestimulierte Insulinsekretion verringert. Dieser Effekt konnte durch eine Verminderung der Zahl der Inseln im Inkubationsmedium, durch Vergrößerung des Inkubationsvolumens sowie durch Zusatz von Meerschweincheninsulinantiserum beseitigt werden. Diese Befunde zeigen den engen Zusammenhang zwischen dem Pentosephosphatshunt und der glucosestimulierten Insulinsekretion. Daß für die Regulierung der Insulinsekretion vor allem der NADPH/NADP-Quotient und nicht der NADH/NAD-Quotient maßgeblich ist, kann aus den Befunden von Veech et al. (1969) abgeleitet werden, die die beiden Quotienten getrennt bestimmten und bei Steigerung der Glucosekonzentration eine stärkere Vergrößerung des NADPH/NADP-Quotienten als des NADH/NAD-Quotienten fanden. Zwar beschrieben Trus et al., (1978), daß der NADH-Gehalt der Insel mit der Insulinsekretion ansteigt, Hedeskov und Capito (1983) berichteten jedoch, daß der auf Grund der Bestimmung von Lactat, Pyruvat und Malat im Cytoplasma berechnete NADPH/NADP-Quotient nach Glucosereiz stark ansteigt, der NADH/NAD-Quotient, der ohnehin viel geringer ist, jedoch unverändert bleibt.

1.1.5 Die Rolle der Thiole bei der Insulinsekretion

Die Aufgabe von NADPH und NADH, den reduzierten Pyridinnukleotiden, ist die Reduktion von oxidierten Substraten. Als geeignetes Substrat in der Langerhansschen Insel kommt das Glutathion in

Frage, das zum Teil als Disulfid vorliegt. Dabei wird die Reduktion des Disulfides durch die Glutathionreductase katalysiert, das reduzierte Pyridinnukleotid dient als Coenzym. Agren et al. (1978) fanden, daß die Glutathionreductase NADPH als Coenzym gegenüber dem NADH bevorzugt. So konnten Ammon et al. (1980) nachweisen, daß bei Stimulation der Insel mit Glucose eine Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten und eine hiermit korrelierende Vergrößerung des NADPH/NADP-Quotienten stattfindet. Diesem Befund entspricht, daß bei einer Steigerung der Insulinsekretion durch Leucin bei substimulatorischer Glucosekonzentration der GSH-Gehalt der Insel ebenfalls ansteigt (Ammon et al., 1981). In der Perfusion konnten Ammon und Abdel Hamid (1981 b) zeigen, daß die Insulinsekretion durch exogen zugeführtes GSH ebenfalls gesteigert werden konnte. Allerdings kann dies nicht der alleinige Regelmechanismus für die Insulinsekretion sein, da zum Beispiel p-Chlormercuribenzoat die Insulinsekretion steigert, jedoch keinen Einfluß auf den GSH-Gehalt der Insel besitzt (Ammon et al., 1977). Die durch Tolbutamid mögliche Steigerung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion geht ebenfalls nicht mit einer Veränderung des GSH/GSSG-Quotienten einher, Tolbutamid selbst beeinflußt den Glucosestoffwechsel nicht (Ammon et al., 1979). Allerdings läßt sich die Wirkung von Tolbutamid und p-CMB durch Thioloxidantien wie Diamid (Kosower et al., 1969) oder Pyridinnukleotidoxidantien wie Methylenblau (Ammon et al., 1973) hemmen, woraus geschlossen werden kann, daß die Steigerungswirkung von Tolbutamid und p-CMB einen hohen Reduktionszustand des GSH/GSSG- und NADPH/NADP-Quotienten als Voraussetzung hat, der nach der Oxidation nicht mehr vorhanden ist. Eine Senkung der Redoxquo-

tienten ist durch exogenes Insulin möglich, es wird hierbei sowohl der NADPH/NADP-Quotient als auch der GSH/GSSG-Quotient gesenkt. Der Hemmeffekt von exogenem Insulin auf die Insulinsekretion läßt sich auch bei der durch p-Chlormercuribenzoat oder Tolbutamid ausgelösten Steigerung beobachten. Dies ist ebenfalls auf den Einfluß des exogenen Insulins auf die Redoxquotienten zurückzuführen (Ammon et al., 1980). Darüber hinaus können der Redoxquotient und analog die Insulinsekretion durch tert.-Butylhydroperoxid gesenkt werden (Ammon et al., 1977). Diamid und DIP, zwei membrangängige Thioloxidantien (Kosower et al., 1969, 1974), oxidieren in der Insel das GSH und hemmen die Insulinsekretion (Ammon et al., 1979, 1983). Auch Thiole, die an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert sind, spielen eine Rolle bei der Insulinsekretion. So kann durch Oxidation der außenseitigen Membranthiole mit dem polaren DIP-Salz (Kosower et al., 1974) bei substimulatorischer Glucosekonzentration die Insulinsekretion gesteigert werden (Ammon et al., 1983). Für das p-Chlormercuribenzoat wird ebenfalls ein Angriff an außenständigen Thiolen diskutiert (Hellmann et al., 1973), da das p-Chlormercuribenzoat nur in sehr geringem Maße in die Zelle eindringt, den GSH-Gehalt der Insel nicht verändert, jedoch trotzdem eine steigernde Wirkung auf die Insulinsekretion zeigt, die durch exogenes Insulin wiederum vermindert werden kann (Ammon et al., 1983). Da zwischen den extrazellulären Thiolen und den freien Thiolen im Intrazellulärraum eine enge Verbindung besteht (Kosower et al., 1982), ergibt sich der im folgenden Schema dargestellte Zusammenhang zwischen dem Glucoseabbau und dem Redoxzustand der Thiole in der

Membran bei der Insulinsekretion:

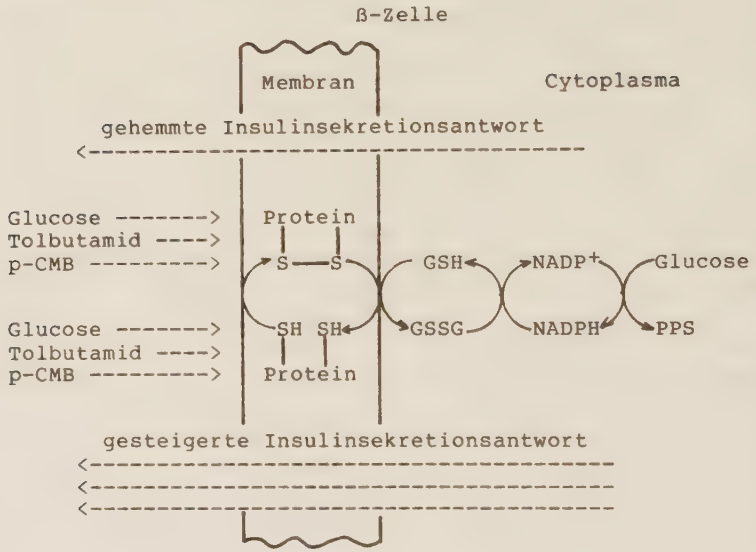


Abb.1-3: Zusammenhang zwischen dem Glucoseabbau und dem Redoxzustand intrazellulärer und membranständiger Thiole (Ammon et al., 1980). Dabei werden die Membranthiole vom Pentosephosphatshunt aus über NADPH und GSH in den reduzierten Zustand versetzt. Wenn Glucose, Tolbutamid oder p-CMB an den membranständigen Thiolen angreifen, wird bei Vorliegen von reduzierten SH-Gruppen eine starke Insulinsekretion ausgelöst; sind die Thiolgruppen dagegen oxidiert, so wird die Insulinsekretion nicht gesteigert

Aus diesen Befunden läßt sich ableiten, daß der Redoxzustand von extra- und intrazellulären Thiolen eine wichtige Funktion bei der Insulinsekretion haben könnte. Dabei ist jedoch anzunehmen, daß die Änderung dieser Redoxzustände nicht das eigentliche Auslösesignal für die Insulinsekretion sein kann, da diese auch ohne Beeinflussung des Thiolsystemes gesteigert werden kann. Vielmehr scheint diesen Thiolen eine Rolle bei der Regulation der Insulin-

antwort auf einen Glucosereiz zuzukommen (Ammon et al., 1980).

1.1.6 Bedeutung der Ionen für die Insulinsekretion

1.1.6.1 Rolle des Calciums

Einen zentralen Punkt für den Ablauf der Insulinsekretion stellt die Konzentration an freiem Calcium im Cytoplasma dar. So konnte in verschiedenen Tierspezies und unterschiedlichen Inselpräparationen in vitro beobachtet werden, daß die Steigerung der Insulinsekretion durch Glucose mit einem Ansteigen der Calciumkonzentration im Cytoplasma verbunden ist (Malaisse, 1973; Sugden und Ashcroft, 1978; Frankel et al., 1978). Dies wurde durch Befunde untermauert, die zeigten, daß in vivo bei einer Hypocalciämie eine Hemmung der Insulinsekretion zu beobachten ist (Little-Dike et al., 1968).

An der Regulation der Calciumkonzentration in der Langerhansschen Insel sind drei Mechanismen beteiligt: die Calciumaufnahme aus dem Extrazellulärraum in die Zelle, die Umverteilung zwischen Cytoplasma und intrazellulären Speichern (Zellorganellen) und die Abgabe von Calcium an den Extrazellulärraum über einen Calciumefflux.

Die Aufnahme von Calcium aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere steht in sehr engem Zusammenhang mit der Insulinsekretion. So konnte Hellmann (1977) zeigen, daß die Aufnahme von radioaktiv markiertem Calcium bei einer Steigerung der Glucosekonzentration im Medium analog zur Steigerung der Insulinsekretion anstieg.

Wenn Calcium aus dem Extrazellulärraum beseitigt wurde, so blieb auch die Insulinsekretion nach Glucosereiz aus. Bei einer Stimulation der Insulinsekretion mit Mannose, L-Leucin oder Tolbutamid bei konstanter Glucosekonzentration wurde ebenfalls eine erhöhte Calciumaufnahme gemessen (Hellmann et al., 1977 b). Diese Calciumaufnahme scheint durch Thiole beeinflußbar zu sein. So konnte Strölin (1983) zeigen, daß bei exogenem Zusatz von reduziertem Glutathion die Calciumaufnahme gesteigert ist. Auf der anderen Seite ist es ebenfalls möglich, durch Oxidation von intrazellulären Thiolen mit DIP, t-BHP oder Diamid die Calciumaufnahme zu hemmen (Ammon et al., 1980 b). Dies korreliert mit den Befunden bei der Insulinsekretion. Bei der gezielten Oxidation von extrazellulären Thiolen mit dem polaren DIP-Salz zeigt sich jedoch nur bei substimulatorischer Glucosekonzentration eine Steigerung der Calciumaufnahme (Ammon et al., 1983). Substanzen, die eine Hemmung der Insulinsekretion bei stimulatorischer Glucosekonzentration erzeugen, wie zum Beispiel Mannoheptulose oder Diazoxid, hemmen ebenfalls die Aufnahme von Calcium in das Cytoplasma (Hellmann et al., 1977 b). Diese Calciumaufnahme in die Zelle läuft über sogenannte "voltage dependent channels" ab, die durch Lanthan (Hellmann et al., 1976) oder Calciumantagonisten wie Verapamil (Malaisse et al., 1977) blockierbar sind und erst bei der Depolarisation der Zellmembran geöffnet werden (Herchuelz et al., 1980).

Ein weiterer Mechanismus für die Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma ist die intrazelluläre Umverteilung. Calcium wird in der Zelle in den Mitochondrien, dem endoplasmatischen

Reticulum und den Insulingranula gespeichert (Schäfer, 1980). Wird die Konzentration von Phosphoenolpyruvat in der Zelle gesteigert, so beobachteten Sugden und Ashcroft (1978) eine verringerte Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien und damit ein Ansteigen des freien Calciums im Cytoplasma. Steigert man den c-AMP-Spiegel in der Zelle, entweder durch Stimulation der Adenylatcyclase (Kuo et al., 1973) oder durch Hemmung der Phosphodiesterase (Ashcroft et al., 1972 c), so wird Calcium aus den Mitochondrien freigesetzt (Randle et al., 1968). Die nach der Gabe von Methylxanthinen oder Isobutyl-1-methylxanthin beobachtete Steigerung des Calciumgehaltes im Cytoplasma ist ebenfalls auf diesen Mechanismus zurückzuführen (Hahn et al., 1979). Durch Stimulation der Calciumfreisetzung aus Mitochondrien über den c-AMP-Gehalt der Inseln kann allerdings alleine keine Insulinsekretion erzeugt werden (Malaisse, 1973, Lacy, 1975). Das freigesetzte Calcium wird unter diesen Bedingungen sofort durch einen erhöhten Efflux aus der Zelle entfernt (Brisson et al., 1972). Andererseits wird nach Steigerung der Calciumaufnahme mit Phosphat (Hellmann und Andersson, 1978) keine Insulinsekretion beobachtet. Auch die durch α-Ketoisovaleriansäure stimulierte Calciumaufnahme führt nicht zu einer Insulinsekretion (Lenzen, 1978). Darüber hinaus kann bei substimulatorischer Glucosekonzentration durch Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration mit dem lipidlöslichen Ionophor A 23187 die Insulinsekretion gesteigert werden. (Ashby und Speake, 1975). Sie kann dann auch durch Oxidation intrazellulärer Thiole mit DIP nicht mehr gehemmt werden (Strölin, 1983). Aus diesen Befunden, sowie aus den Befunden von Hellmann und Axelsson (1978), daß das durch Phosphat ver-

stärkt aufgenommene Calcium vor allem in den Mitochondrien gespeichert wird, läßt sich schließen, daß für die Insulinsekretion nicht nur eine Erhöhung der Calciumkonzentration in der Zelle notwendig ist, sondern daß auch die richtige Verteilung zwischen der Lagerstätte in der Zelle, dem sogenannten Mitochondrienpool, und dem im Cytoplasma frei vorhandenen sowie dem in den Insulingranula gespeicherten, leicht zugänglichen Calcium gegeben sein muß. Darüber hinaus zeigt sich aber, daß nach einer Erhöhung der Calciumkonzentration in diesem Sinne der weitere Ablauf der Insulinsekretion nicht mehr von Thiolen abhängig ist.

Die dritte Methode für die Regulation der Calciumkonzentration in der Zelle ist der Calciumefflux. Dabei wird Calcium entgegen einem Konzentrationsgefälle auf zwei verschiedenen Wegen aus der Insel ausgeschleust. Der erste Weg ist der sogenannte " frühe " Efflux, der durch eine calciumaktivierbare ATP-ase durch die intakte Zellmembran hindurch abläuft und bei dem Calcium gegen Natrium ausgetauscht wird (Löffler und Kemmler, 1975). Als Antwort auf einen Glucosereiz wird dieser frühe Efflux zunächst stark gehemmt, nach einigen Minuten jedoch wieder stark gesteigert (Malaisse, 1973; Bukowiecki und Freinkel, 1976; Herchuelz und Malaisse, 1978). Diese zweite Steigerung des Effluxes wird als " später " Efflux bezeichnet. Die Hemmung des frühen Effluxes ist anscheinend unabhängig von der Insulinsekretion, sie ist auch bei einer Beeinflussung der Insulinsekretion durch Hemmstoffe wie Magnesium zu beobachten (Herchuelz und Malaisse, 1978). Es wird deshalb postuliert, daß diese Effluxhemmung entweder durch direkte Beeinflussung verursacht wird (Malaisse, 1973) oder dieser

Schritt vor dem Wirkort von Hemmstoffen lokalisiert ist. Von einer gesteigerten Wiederaufnahme kann die Verminderung des frühen Effluxes nicht herrühren, da sie auch bei Verhinderung der Wiederaufnahme des abgegebenen Calciums durch Komplexierung zu beobachten ist (Herchuelz und Malaisse, 1980 b). Ausgelöst wird die Hemmung des frühen Effluxes entweder durch eine energieabhängige Änderung der Membranpermeabilität (Formby et al., 1976) oder durch anderweitigen Verbrauch des für den Betrieb der ATP-ase notwendigen ATP (Schäfer, 1980). Der der Hemmung des frühen Effluxes folgende späte Efflux ist möglicherweise auf eine Ausschleusung von Calcium über die Exocytose der Insulingranula zurückzuführen. Dies scheint vor allem deshalb naheliegend zu sein, da dieser Efflux zeitlich mit der Insulinsekretion zusammenfällt (Hellmann et al., 1971). Da jedoch diese Effluxzunahme auch zu beobachten ist, wenn die Insulinsekretion durch Hunger (Gylfe und Hellman, 1978) oder L-Epinephrin (Lernmark und Hellman, 1970) gehemmt ist, kann die Ausschleusung von Calcium aus der Zelle über die Insulingranula und die Exocytose nicht der einzige Weg für den späten Efflux sein. Gylfe und Hellman (1978) postulierten deshalb, daß als Ursache für den späten Efflux die Depolarisation der Zellmembran beim Aktionspotential in Frage kommt. Nach Herchuelz und Malaisse (1978) ist dieser Calciumefflux proportional zur Calciumaufnahme. Dies wird dadurch bestätigt, daß durch Verapamil in hoher Konzentration (> 20 mM) oder Verdrängen des Calciums durch Magnesium (Malaisse et al., 1976) der späte Calciumefflux ebenfalls vermindert ist. Auch ist bei einem Ersatz des Calciums im Außenmedium durch Barium zwar eine Steigerung der Insulinsekretion durch Glucose zu beobachten, der

Calciumefflux ist jedoch nicht entsprechend der Bariumaufnahme gesteigert (Herchuelz und Malaisse, 1978).
Ob die Insulinsekretion nun von einem der drei Wege zur Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma mehr oder weniger abhängig ist, kann derzeit noch nicht beurteilt werden. Fest steht lediglich, daß eine Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma durch Aufnahme von Calcium aus dem Extrazellulärraum für die Auslösung der Insulinsekretion durch Glucosereiz unter Beibehaltung eines speziellen Verteilungsmusters in der Zelle absolut notwendig ist. So konnten Wollheim et al. (1983) durch direkte Bestimmung des freien Calciums im Cytosol zeigen, daß die Insulinsekretion von einem Ansteigen der Konzentration an freiem Calcium begleitet ist. Bei Abwesenheit von Calcium im Medium ist die Auslösung der Insulinsekretion durch alleinige Umverteilung des intrazellulär gespeicherten Calciums nicht möglich.

1.1.6.2 Rolle des Kaliums bei der Insulinsekretion

Eine Bedeutung von Kalium für die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion konnte durch eine Vielzahl von in vivo Studien beobachtet werden. So findet sich zum Beispiel bei Erkrankungen, die mit einer Hypokaliämie einhergehen, wie zum Beispiel Mangelernährung (Mann et al., 1975), Nierenfunktionsstörungen (Spergel et al., 1967) oder nach Behandlungen mit Thiaziddiuretika (Goldner et al., 1960), eine Glucoseintoleranz. Eine experimentelle Verringerung des Kaliumgehaltes im Organismus durch diätetische Ernährung führt bei Ratten (Spergel et al., 1967 b) ebenfalls zu

einer Verschlechterung der Glucosetoleranz. Diese Glucoseintoleranz konnte auf eine Störung in der Insulinsekretionsantwort auf einen Glucosereiz zurückgeführt werden (Spergel et al., 1967), da die Sensibilität für Insulin weiterhin in vollem Umfang vorhanden war und im Serum sogar eine gesteigerte Konzentration an inaktivem Proinsulin zu beobachten war (Sagild et al., 1961). Nach Substitution des mangelnden Kaliums kann eine zumindest teilweise Verbesserung der Glucosetoleranz beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu wird bei Infusion von Kalium nach dem Erreichen genügend hoher Serumkonzentrationen eine gesteigerte Insulinsekretion gefunden. Der Glucosespiegel im Serum zeigt jedoch nur bei ausgangs negativer Kaliumstoffwechsellage einen Abfall, da im Normalfall gleichzeitig mit der Insulinsekretion eine durch Kalium ausgelöste Glukagonsekretion stattfindet. Bei in vitro durchgeführten Studien mit Teilchen von Kaninchenpankreas (Milner und Hales, 1968) und foetalem Pankreas (Lambert et al., 1969) konnte gezeigt werden, daß die Insulinsekretion bei substimulatorischer Glucosekonzentration und unter Abwesenheit von Kalium gering gesteigert ist, bei sehr niedrigen Kaliumkonzentrationen im Medium jedoch sowohl bei hoher als auch bei niedriger Glucosekonzentration gehemmt ist (Lambert et al., 1974). Bei der Perifusion von isolierten Inseln konnten Henquin und Lambert (1974) zeigen, daß bei einer Entfernung von Kalium aus dem Medium und gleichzeitiger Erhöhung der Glucosekonzentration die Insulinsekretion normal abläuft. Wenn aber das Kalium schon 25 Minuten vor dem Glucosereiz entfernt wurde, so war die Insulinsekretion vermindert. Diese Hemmung konnte auch durch einen gleichzeitig mit dem

Glucosereiz durchgeführten neuerlichen Kaliumzusatz nicht beseitigt werden. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß für die Insulinsekretion vor allem eine bestimmte Konzentration an intrazellulärem Kalium notwendig ist, die in einem kaliumfreien Medium nicht aufrecht erhalten werden kann (Dunham und Glynn, 1961). Bei der In-vitro-Inkubation von Pankreasgewebe zeigten Grodsky und Bennett (1966), daß bei einer Verdopplung der Kaliumkonzentration und Abwesenheit von Glucose im Inkubationsmedium die Insulinsekretion gesteigert wird. Allerdings verläuft diese Insulinsekretion, wie Henquin und Lambert (1974) in der Perifusion zeigen konnten, mit einem zeitlich kurzen, aber relativ starken Peak, die sonst nach Glucosestimulation zu beobachtende biphasische Sekretionsdynamik war verschwunden. Bei einer Entfernung des Calciums aus dem Medium oder bei Zusatz von Calciumantagonisten wie Verapamil fand diese Insulinsekretion nicht mehr statt. Der Kaliumeffekt war jedoch durch Atropin oder Propranolol nicht zu beeinflussen, dies zeigt, daß dieser Stimulation der Insulinsekretion durch Kalium kein nervaler Mechanismus zugrunde liegen kann. Werden Inseln über längere Zeit einer hohen Kaliumkonzentration ausgesetzt, so verändert sich die Kinetik der Insulinsekretion nach Glucosereiz vom biphasischen Verlauf zu einem langsamen Anstieg der Sekretionsleistung. Dieser Effekt kann ebenfalls nicht auf nervale Einwirkungen zurückgeführt werden. Wenn die Kaliumkonzentration jedoch mindestens 10 Minuten vor dem Glucosereiz auf den normalen Wert erniedrigt wurde, so normalisierte sich die Kinetik wieder. Diese Befunde gaben Anlaß zu der Hypothese, daß die Insulinsekretion durch eine kaliuminduzierte Membrandepolarisation, die zu einer Öffnung von Calciumkanälen

führt, vermittelt wird (Henquin und Lambert, 1974).

Zwei Wege ermöglichen die Veränderung des Kaliumgehaltes in der Zelle: die Aufnahme von Kalium über eine K / Na -Pumpe sowie die Abgabe von Kalium über den passiven Efflux aus der Insel. Howell und Taylor (1968) konnten durch direkte Messung des Kaliumgehaltes in der Insel mittels Atomabsorption zeigen, daß dieser durch Glucose gesteigert werden kann. Mit Strophanthin, einem Hemmstoff für die Funktion der K / Na -ATP-ase, konnte dieser Effekt verringert werden. Bei den meisten, von anderen Autoren erstellten Arbeiten wurde, wie dies auch an anderen Geweben beschrieben ist (Bonting, 1970), das Kalium durch Markierung mit radioaktivem ^{86}Rubidium gemessen. Sehlin und Täljedahl (1974) sowie Boschero et al. (1977) zeigten, daß ^{86}Rubidium als Tracer für Kaliumfluxe in der ß-Zelle verwendet werden kann. Dabei bestätigten Sehlin und Täljedahl (1974) die durch direkte Kaliummessung gefundenen Effekte und fanden gleichzeitig, daß die ß-Zelle bei Stimulation durch D-Glucose in der Lage ist, das Kalium bis auf den 44-fachen Wert der physiologischen Konzentration im Außenmedium zu kumulieren. Bei einer Stimulation der Insel mit L-Glucose oder mit methylierter Glucose konnte diese Akkumulation nicht beobachtet werden (Sehlin und Täljedahl, 1974). Eine vergleichende Messung der Rubidiumaufnahme und des Natriumeffluxes zeigte jedoch, daß beide durch Steigerug der Glucosekonzentration nicht beeinflußt wurden. Die beobachtete Akkumulation ist also nicht auf gesteigerte Aufnahme, sondern auf einen verringerten Efflux zurückzuführen.

Henquin (1978, 1978 b, 1980) konnte sowohl bei mit ^{42}Kalium als

auch bei mit ^{86}Rubidium beladenen Inseln eine Hemmung des Effluxes durch Glucose zeigen. Dabei verlief die Hemmung bei beiden Isotopen qualitativ und quantitativ vergleichbar, so daß bei weiteren Arbeiten auf das leichter zu handhabende Rubidium zurückgegriffen werden konnte. Der bei der Perifusion von isolierten Inseln gemessene Rubidiumefflux, der als Maß für den echten Kaliumefflux zu betrachten ist, verläuft bei Anwesenheit von niedrigen Glucosekonzentrationen mit einer Halbwertszeit von etwa 16 Minuten (Sehlin und Täljedahl, 1974). Wird das System mit D-Glucose stimuliert, so zeigt sich eine Hemmung des Rubidiumeffluxes, die bei Steigerung der Glucosekonzentration von 3 mM bis 6 mM stark vergrößert wird, bei 6 mM Glucose jedoch ein Maximum erreicht hat (Henquin et al., 1974, 1980; Carpinelli und Malaisse, 1981). Bei einer Hemmung des Effluxes mit einer hohen Glucosekonzentration (16,7 mM) fanden Carpinelli und Malaisse (1981) sowie Lebrun et al. (1982) nicht nur, daß der Efflux nicht noch stärker als bei 6 mM Glucose gehemmt wurde, sondern sie beobachteten eine kurzfristige Steigerung des Rubidiumeffluxes unmittelbar nach der erfolgten Hemmung. Dieser Effekt konnte bei Abwesenheit von Calcium im Medium oder nach Zusatz von Verapamil beseitigt werden. Analog hierzu konnte Henquin (1979) zeigen, daß bei einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration der Rubidiumefflux gesteigert wurde. Wurde die Calciumaufnahme durch das Ionophor A 23187 erhöht, so fand sich eine starke Steigerung des Rubidiumeffluxes, die durch eine hohe Glucosekonzentration teilweise unterdrückt werden konnte. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, daß der Rubidiumefflux als Gegenregulation zur Calciumaufnahme verändert wird, um das Ladungsgleichgewicht in

der Zelle zu erhalten. Wird der c-AMP-Gehalt der Zelle erhöht, so findet sich ebenfalls eine Steigerung des Rubidiumeffluxes, die wahrscheinlich auf die Freisetzung von mitochondrialem Calcium zurückzuführen ist und ebenfalls dem Ladungsausgleich dient (Carpinelli und Malaisse, 1980 b). Dieser Gegenregulationsmechanismus scheint jedoch von der Glucosewirkung überlagert zu werden, so daß der Schluß möglich erscheint, daß der Rubidiumefflux direkt von der Glucose oder ihren Abbauprodukten beeinflußt wird, gleichzeitig jedoch eine Rückkopplung von der Calciumaufnahme auf den Rubidiumefflux stattfindet. Die Hemmung des Rubidiumeffluxes durch Glucose fällt in ihrem zeitlichen Ablauf mit dem Anspringen der Insulinsekretion nach Glucosereiz zusammen (Malaisse et al., 1981). Bei einer Hemmung der Calciumaufnahme mit Cobalt wird der Rubidiumefflux nach Glucosereiz zwar noch gehemmt, die Insulinsekretion jedoch nicht gesteigert. Es ist also eine Trennung der Rubidiumeffluxhemmung und der Insulinsekretion möglich (Henquin, 1980 b). Eine Hemmung des Rubidiumeffluxes kann außer mit D-Glucose auch durch Mannose, Glucosamin, N-Acetylglucosamin, Pyruvat und Lactat durchgeführt werden. Mit Galaktose und 3-O-Methylglucose kann der Rubidiumefflux nicht gehemmt werden (Henquin, 1980). Diese Ergebnisse entsprechen den Befunden bei der Insulinsekretion. So wird diese durch die Stoffe, die den Rubidiumefflux hemmen, gesteigert. Dementsprechend sind Galaktose und 3-O-Methylglucose auch nicht zu einer Steigerung der Insulinsekretion in der Lage. Den tatsächlichen Zusammenhang zwischen der Kaliumeffluxhemmung und dem Auslösen einer Insulinsekretion konnte Henquin (1977) zeigen. Tetraethylammonium (TEA), das an Nerven

und Muskelzellen für seine Kaliumflux-blockierende Wirkung bekannt ist, führt an der Langerhansschen Insel, wie zu erwarten ist, zu einer Hemmung des Kaliumeffluxes und konnte bei Anwesenheit von 6 mM Glucose, einer substimulatorischen Konzentration, eine starke Insulinsekretion auslösen. Bei niedriger Glucosekonzentration (2 mM) konnte TEA zwar eine Hemmung des Rubidiumeffluxes erzeugen, jedoch keine Insulinsekretion. Dies zeigt, daß für die Auslösung der Insulinsekretion eine Hemmung des Rubidiumeffluxes notwendig ist, jedoch die Hemmung des Rubidiumeffluxes alleine, im Gegensatz zur Calciumaufnahme, nicht für die Sekretionsauslösung genügt. Eine Beeinflussung der Insel auf nervalem Wege durch das TEA kann ausgeschlossen werden, da sowohl der Zusatz von Atropin als auch von Propranolol keine Veränderung der TEA-Wirkung zeigt.

Auch die Aminosäuren, die die Insulinsekretion steigern können, wie zum Beispiel Leucin, und deren Wirkung durch den Metabolismus erklärt wird, hemmen den Kaliumefflux. Dies gilt auch für 4-Methyl-2-Oxopentanoat, einem Metaboliten des Leucins (Malaisse et al., 1981 b). Im Gegensatz hierzu steht der Befund, daß Arginin die Insulinsekretion steigert, den Kaliumefflux jedoch ebenfalls. Dies ist auf die Akkumulation der Substanz und damit von positiven Ladungen in der Zelle zurückzuführen (Henquin und Meissner, 1981). Aufgrund dieser Unterschiede untersuchten Charles et al. (1982) den Zusammenhang zwischen der Aminosäurestruktur und einem eventuellen Einfluß auf den Rubidiumefflux. Sie fanden, daß alle Aminosäuren mit kationischer Struktur, wie Arginin, eine Steigerung des Rubidiumeffluxes verursachen, unabhängig von der Calcium- oder Natriumkonzentration im Medium, also direkt durch ihre

eigene Ladung. Dieser Effekt verschwindet bei Derivaten, die ein anderes Ionisationsmuster besitzen. Aber auch neutrale Aminosäuren, wie Valin oder Norleucin, zeigen eine Steigerung des Rubidiumeffluxes, die jedoch durch Abwesenheit von Natrium im Medium unterdrückt wird. Diese Aminosäuren werden wahrscheinlich, wie in anderen Geweben, an Natrium gebunden in die Zelle aufgenommen und beeinflussen so die intrazellulären Ladungsverhältnisse. Der Effekt von basischen Aminosäuren konnte nicht untersucht werden, da deren Ladung bei dem vorliegenden, notwendigen physiologischen pH-Wert nicht stabil genug ist.

Für Nervenfasern wurde beschrieben (Hille, 1968; Schrager, 1974), daß die Kaliumleitfähigkeit im sauren Milieu vermindert ist. Da die Stimulation der Langerhansschen Insel durch Glucose zu einem Ausstrom von Protonen führt (Malaisse et al., 1979), gleichzeitig bei Glucoseabbau in der Insel auch Protonen entstehen, wurde von Henquin (1981 b) untersucht, ob die Kaliumeffluxhemmung nach Glucosestimulation eventuell durch entstehende Protonen vermittelt wird. Dazu untersuchte er den Einfluß von intra- und extrazellulären pH-Wertänderungen auf den Rubidiumefflux bei Abwesenheit von Glucose. Er konnte zeigen, daß bei einer Ansäuerung des Außenmediums der Rubidiumefflux dosisabhängig gehemmt wird. Eine Alkalisierung der Medien führte dann auch zu einer Steigerung des Rubidiumeffluxes. Bei der Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch Veränderung des pCO_2-Wertes im Medium bei konstantem pH-Wert im Außenmedium zeigte sich überraschenderweise eine qualitativ gleiche Wirkung wie bei der extrazellulären pH-Wertänderung, die intrazelluläre Änderung war jedoch quantitativ erheb-

lich geringer. Carpinelli und Malaisse (1980) untersuchten den Einfluß einer Alkalisierung des Außenmediums bei Anwesenheit von Glucose als Modell für eine relative Acidisierung des Intrazellulärraumes gegenüber dem Außenmedium. Dabei konnten sie jedoch nur die der Alkalisierung des Außenmediums entsprechende Steigerung des Rubidiumeffluxes finden. Bei der Bestimmung des pH-Wertes im Intrazellulärraum mit der DMO-Methode (Hellmann et al., 1972) konnte jedoch nach Glucosestimulation (20 mM) der Insel keine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes gemessen werden. Nach der von Henquin ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der extrazellulären pH-Wertsteigerung und der Hemmung des Rubidiumeffluxes müßte die intrazelluläre pH-Wertänderung bei alleiniger Vermittlung der glucoseinduzierten Effluxhemmung auf diesem Wege mindestens 0,6 bis 0,9 pH-Einheiten betragen, die auch bei Berücksichtigung der methodischen Grenzen durch die DMO-Methode nachweisbar sein müßten. Auch zeigt Ammoniumchlorid zwar eine Steigerung des Rubidiumeffluxes, jedoch keine meßbare Änderung des intrazelluären pH-Wertes (Sener et al., 1978). Dieser überraschende Effekt ist wahrscheinlich auf die große Pufferkapazität im Intrazellulärraum zurückzuführen. Hierdurch wird auch erklärt, weshalb die von außen versuchte Veränderung des intrazellulären pH-Wertes einen so viel kleineren Effekt auf den Rubidiumefflux zeigt als die extrazelluläre Änderung.

Eine sicher bedeutungsvolle Rolle für den Rubidiumefflux spielt dagegen der NAD(P)H/NAD(P)-Quotient. Zwar zeigt der Zusatz von NADPH oder NADH zum Medium bei Abwesenheit von Glucose keine Wirkung (Henquin, 1980), jedoch kann durch Pentobarbital, das die NADPH- und NADH-Konzentration in der Zelle stark erhöht (Panten

et al., 1973), der Rubidiumefflux schnell und reversibel gehemmt werden. Der gegenteilige Effekt, die Oxidation der intrazellulären reduzierten Pyridinnukleotide mit Phenazinmethosulfat oder Methylenblau führt zu einer Steigerung des Rubidiumeffluxes, wobei bei den verwendeten Konzentrationen der ATP-Gehalt sowie der Glucosemetabolismus unbeeinflußt blieben (Henquin, 1980). Auch Menadion, das den Gehalt an verfügbaren reduzierten Pyridinnukleotiden senkt, antagonisiert die Hemmwirkung von Glucose auf den Rubidiumefflux (Malaisse et al., 1978 b). Die Bedeutung der reduzierten Pyridinnukleotide liegt vor allem in der Bereitstellung von intrazellulären reduzierten Thiolen (Hellmann et al., 1974). Daß diese freien Thiolgruppen im Zellinnern auch für den Rubidiumefflux von Bedeutung sind, konnte Henquin (1980) zeigen. So wurde der Rubidiumefflux bei Anwesenheit von Glucose durch t-BHP, das intrazelluläre Thiole oxidiert, stark erhöht. Die Beeinflussung membranständiger, extrazellulärer Thiole durch oxidiertes Glutathion zeigte dagegen keine Wirkung. Auch reduziertes Glutathion hatte bei Glucoseanwesenheit keinen Einfluß auf den Rubidiumefflux. Lediglich bei Abwesenheit der Glucose und sehr hoher Glutathionkonzentration (10 mM) war eine schwache Hemmung des Effluxes meßbar. Diese könnte jedoch durch intrazelluläre Effekte ausgelöst sein, die trotz der schlechten Membrangängigkeit des Glutathions bei dieser Konzentration nicht ausgeschlossen werden können.

Das Antidiabetikum Tolbutamid, eine Art Mustersubstanz für die Sulfonylharnstoffe, zeigt bei der Perifusion von Inseln bei niedriger Glucosekonzentration eine Steigerung der Insulinsekretion,

bei hoher Glucosekonzentration eine Potenzierung deren Wirkung. Auf den Rubidiumefflux wirkt das Tolbutamid, unabhängig von der Glucosekonzentration, hemmend. Der Effekt des Tolbutamid auf den Rubidiumefflux bei niedriger Glucosekonzentration kann jedoch durch Erhöhung der Glucosekonzentration noch verstärkt werden (Henquin, 1980 c). Als entgegengesetzt wirkende Substanz gilt das Diazoxid, das bei chronischer Hypoglycämie angewendet wird. Das Diazoxid hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion, nicht jedoch die durch Kalium oder Arginin ausgelöste. Auf den Rubidiumefflux wirkt das Diazoxid steigernd. Alle Wirkungen des Diazoxides sind dabei durch Tolbutamid völlig antagonisierbar. Aus diesem Befund läßt sich eine Bedeutung des Rubidiumeffluxes bei der Wirkung der Sulfonylharnstoffe ableiten (Henquin und Meissner, 1982).

Auch am diabetischen Modell wurde der Rubidiumefflux untersucht. Dabei zeigte sich beim Vergleich von genetisch-diabetischen Mäusen (C57 BL/KsJ db/db) mit entsprechenden normalen Tieren (C57 BL/KsJ +/+), daß bei den diabetischen Tieren der Rubidiumefflux durch Glucose nicht gehemmt werden konnte (Berglund et al., 1980). Allerdings war auch die Rubidiumaufnahme vermindert, so daß sich die Zellen in einer Art Dauerdepolarisationszustand befanden (Berglund et al., 1978).

Ein weiteres Modell für den Diabetes ist die Behandlung mit Alloxan. Dabei zeigt das Alloxan bei niedriger Glucosekonzentration eine starke Steigerung des Rubidiumeffluxes. Diese Steigerung kann durch hohe Glucosekonzentrationen, aber auch durch 3-O-Methylglucose beseitigt werden. Auch D-Glycerinaldehyd und α-Ketoisocapronsäure konnten den Rubidiumefflux trotz Alloxanvorbe-

handlung weiterhin hemmen. Es wird angenommen, daß das Alloxan über den Hexosecarrier, der von 3-O-Methylglucose blockiert werden kann, in die Zelle gelangt und dort zu mehr allgemeinen Funktionsstörungen führt (Henquin et al., 1979 b).

1.1.7 Rolle der elektrischen Aktivität der Zelle

Dean und Matthews (1968, 1970) beschrieben als erste, daß die Insulinsekretion von elektrischen Aktivitäten der ß-Zelle begleitet ist. Diese elektrische Aktivität, eine Veränderung des bei etwa -60 mV liegenden Ruhepotentiales, war durch einen Anstieg des Potentiales auf etwa -30 mV sowie durch darauf aufgesetzte Potentialspitzen, die im Durchschnitt etwa -20 mV erreichten, gekennzeichnet.

Beim Ruhepotential der ß-Zelle handelt es sich um ein Kaliumdiffusionspotential, das durch den Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle, unter Zurücklassen des Anions, entsteht. Dieses Ruhepotential beträgt etwa - 60 mV (Meissner et al., 1978). Wird die Insel nun durch Glucose stimuliert, so kommt es zunächst zu einer langsamen Verminderung des Potentiales. Hat sich dieses um etwa 4 - 5 mV verringert, so findet ein schlagartiger Potentialanstieg, ein "burst", auf ungefähr -30 mV statt. Diesem Potentialanstieg schließen sich mehr oder weniger regelmäßige Oszillationen, die "spikes", an, die Potentialschwankungen von etwa 7 - 25 mV darstellen. Ein Potentialanstieg über 0 mV wird jedoch nicht beobachtet. Die Dauer dieser Spikeaktivität hängt von der Glucosekonzentration ab und beträgt bei 11,1 mM etwa 4 Sekunden. Danach

sinkt das Potential wieder langsam auf den Ruhepotentialwert ab, und die Depolarisation beginnt von neuem. Die Dauer eines solchen, als "slow wave" bezeichneten, Ruhe-Depolarisations-Repolarisations-Zyklus ist ebenfalls von der Glucosekonzentration abhängig und beträgt bei 11,1 mM etwa 10 Sekunden (Meissner und Schmelz, 1974). Diese elektrische Zellaktivität wird folgendermaßen erklärt: Durch die Glucosestimulation kommt es zu einer Hemmung des Rubidiumeffluxes (Henquin, 1978 b). Diese Effluxhemmung führt zu der beschriebenen, langsamen Potentialsteigerung von etwa 5 mV. Durch diese "relative Depolarisation" werden die Calciumkanäle geöffnet, und das extrazelluläre Calcium strömt massiv in die Zelle ein. Dieser Vorgang führt zum schnellen Ansteigen des Potentiales, den bursts. Die auf diese aufgesetzten spikes könnten dann als Folge der Emeiocytosis der Insulingranula aus der ß-Zelle und den dadurch veränderten Widerstandsverhältnissen an der Membran verstanden werden. Dies erklärt auch die Korrelation der Dauer der Spikeaktivität und der Insulinsekretion. Die anschließende Repolarisation ist auf ein Nachlassen des Calciumeinstromes, eine allmähliche Steigerung des Kaliumeffluxes eventuell auf eine gesteigerte Aktivität der K/Na-Pumpe zurückzuführen (Meissner und Schmelz, 1974). Glucose beeinflußt nun konzentrationsabhängig die Dauer dieser bursts, vor allem durch Verlängerung der Spikeaktivität. Die Verlängerung der Spikeaktivität findet jedoch nicht bei jedem Zyklus statt, sondern, ebenfalls glucosekonzentrationsabhängig, in Form von Oszillationen. Auch zeigen nicht alle ß-Zellen einer Insel diese Oszillationen, bei einem Teil ist kein Auftreten von verlängerten bursts zu

beobachten. Der Anteil der Zellen mit Oszillationen steigt proportional zur Glucosekonzentration an. Bei 10 mM Glucose beträgt er etwa 20 %, bei 15 mM etwa 50 % (Henquin et al., 1982 b). Daß diese Änderungen des Membranpotentiales tatsächlich durch die Kalium- und Calciumfluxe verursacht sind, kann durch Beeinflussung der Ionenfluxe und die daraufhin sichtbaren Abweichungen im Potentialverlauf untermauert werden. Valinomycin, das als Kaliumionophor wirkt und den Kaliumefflux steigert, führt elektrophysiologisch zu einer Hyperpolarisierung der Zellmembran und damit zu einem Verschwinden der Burst- und Spikeaktivität (Henquin, 1978 c). Arginin, das den Kaliumefflux ebenfalls steigert, führt nun zu einer gesteigerten Spikeaktivität, wobei die Repolarisationsphasen verschwinden. Dies stellt, trotz der Effluxsteigerung, eine Art Dauerdepolarisationszustand dar, der auf die positive Ladung des Arginins zurückzuführen ist. Leucin und α-Ketoisocapronsäure, die beide den Rubidiumefflux hemmen, führen zu einer Depolarisation der Membran und lösen Spikeaktivität aus (Henquin und Meissner, 1981). Wird dagegen die Calciumaufnahme durch Chinin gehemmt, so findet zwar noch eine schwache Depolarisation der Membran statt, die Burst- und Spikeaktivität unterbleibt jedoch (Atwater et al., 1979). Dieser Befund entspricht den Ergebnissen in calciumfreien Medien, wo ebenfalls nur eine schwache Depolarisation um etwa 4 - 5 mV zu beobachten war (Meissner und Schmelz, 1974). Dies zeigt, daß das Entstehen der bursts durch das Calcium bedingt ist.

Auch Tolbutamid und Diazoxid beeinflussen die elektrische Aktivität der Zelle. So führt das Tolbutamid durch die Hemmung des Kaliumeffluxes zu einer Depolarisation der Membran mit Burst- und

Spikeaktivität. Auch dieser Effekt des Tolbutamid ist durch Diazoxid, das alleine eine Hyperpolarisation der Membran verursacht, voll antagonisierbar (Henquin und Meissner, 1982).

Eine Steigerung der Adenylatcyclaseaktivität durch Forskolin (Niki et al., 1982), die zu einem erhöhten cAMP-Gehalt in der Zelle führt, verändert die elektrische Aktivität der Zelle dahingehend, daß es die Frequenz der slow waves durch Verkürzung der Repolarisationsphase steigert. Da dieser Effekt durch Cobalt, das die Calciumaufnahme hemmt, unterbunden werden kann, ist anzunehmen, daß das cAMP einen direkten Einfluß auf die Calciumkanäle in der Zellmembran besitzt.

1.2 Fragestellung

1.2.1 Methodische Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Messung des Kaliumeffluxes von Langerhansschen Inseln der Ratte aufgestellt werden. Dazu sollte versucht werden, Inseln mit radioaktivem ^{86}Rubidium als Tracer für Kaliumfluxe zu beladen. Nach Erreichen des steady-state sollte dann versucht werden, den Rubidiumefflux sowie seine Beeinflußbarkeit im nicht radioaktiven Medium zu messen. Hierzu sollte zunächst ein Versuchsaufbau verwendet werden, bei dem die Effluxmessung in einem statischen System durch Inkubation erfolgt (Sehlin, 1974). Sollte sich dieses System für eine Untersuchung der Beeinflußbarkeit des Effluxes durch exogen zugeführte Substanzen als zu unempfindlich erweisen, so sollte mittels der Perifusion von Inseln versucht werden, die Untersuchungen auf dynamischem Wege durchzuführen (Henquin, 1978).

1.2.2 Wissenschaftliche Fragestellung

Die Rolle intrazellulärer und extrazellulärer Thiole bei der Insulinsekretion wurde von unserem Arbeitskreis untersucht und mehrfach beschrieben (Ammon et al., 1980, 1981, 1983). Dabei war deutlich geworden, daß die Insulinsekretion nach Glucosereiz offenbar vom Redoxzustand der Pyridinnukleotide sowie der intrazellulären und der extrazellulären Thiole abhängig ist. Durch weiterführende Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die

Aufnahme von ^{45}Calcium in die Langerhanssche Insel der Ratte ebenfalls durch die Veränderung des Redoxzustandes der intra- und extrazellulären Thiole beeinflußt werden kann.

Aufgabe dieser Arbeit war es nun, zu klären, ob der Rubidiumefflux durch die Oxidation von intrazellulären Thiolen mit DIP sowie die Oxidation von extrazellulären Thiolen mit DIP-Salz ebenfalls beeinflußt werden kann. Für das DIP war bekannt, daß es intrazelluläres Glutathion oxidiert (Kosower et al., 1974), die Insulinsekretion hemmt (Eujen, 1978) und die Nettocalciumaufnahme in die Insel ebenfalls vermindert (Hägele, 1981). DIP-Salz ist durch seine polare Struktur nicht in der Lage, in die Zelle einzudringen (Kosower et al., 1974). Nach den Befunden von Ammon et al. (1983) steigert DIP-Salz die Insulinsekretion bei substimulatorischer Glucosekonzentration. Auch die Calciumaufnahme wird bei niedriger DIP-Salzkonzentration beeinflußt.

Die zu erwartenden Befunde sollten nun gemeinsam mit früheren Beobachtungen unseres Arbeitskreises die Frage nach der Lokalisation der Thiole bei der Insulinsekretion beantworten helfen. Ammon et al. (1980, 1983) hatten zeigen können, daß die Insulinsekretion nach Glucosereiz sowohl vom Redoxzustand intrazellulärer wie auch extrazellulärer Thiole abhängig ist. Ammon et al. (1983) und Strölin (1983) konnten nachweisen, daß die Calciumaufnahme ebenfalls der Regulation durch den Redoxzustand der intra- und extrazellulären Thiole unterliegt. Ferner beobachtete Strölin (1983), daß die nach der Calciumaufnahme lokalisierten Schritte der Sekretionskaskade vom Thiolsystem offensichtlich nicht beeinflußt werden. Es war nun die Frage zu klären, inwieweit der Kaliumefflux ebenfalls vom Redoxzustand der intrazellulären und

extrazellulären Thiole abhängig ist, oder ob die Regulationswirkung der Thiole vorwiegend der Calciumaufnahme zuzuordnen ist.

2 Material

2.1 Verwendete Tiere

Für die hier beschriebenen Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden in einem temperatur- und lichtkontrollierten Raum bei 24 °C gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage, Lippe, und Trinkwasser ad libitum. Das Alter der verwendeten Tiere betrug drei bis fünf Monate, das Körpergewicht 250 g bis 400 g.

2.2 Geräte

Stereomikroskop:	Nikon SM 6
Schüttelwasserbad:	Fa. Köttermann
pH-Meter:	Beckmann Digital pH-Meter Modell 3560 Beckmann pH-Meter H 5
Rechner:	Apple II Europlus 64K Olivetti Tischcomputer p 602
Ultraschallbad:	Econoclean, Fa. Spirig, Rapperswil
Nylonnetze:	Fa. Maierthaler, Köln; Fadendicke 50 µm, Maschenweite 54 µm
Polystyrolröhrchen:	Fa. Greiner, Nürtingen
Szintillationszähler:	Gamma-Counter Nuclear Chicago Packard TRI CARB Liquid Scintillation Spectrometer Model 3385
Membranfilter:	Sartorius Typ N 11301, Poren 8,0 µm
Fraktionssammler:	LKB Ultrorack 2020
Schlauchpumpe:	Gilson
Pumpenschläuche:	Abimed, Stärke 2,0 mm
Teflonschläuche:	Fa. Latek, Heidelberg, Durchmesser 0,8 mm
Dialyseschläuche:	Visking Nr. 44120, Schlauch 36/32
Vierwegehähne:	Fa. Latek, Typ PA 875
Zentrifuge:	Eppendorf 5413
Plexiglashaube:	Eigenbau
Plexiglaskammern:	Eigenbau

2.3 Chemikalien

2.3.1 Bezogene Chemikalien

Collagenase (125-196 uE/mg):	Worthington Biochem. Corp. Freehold, USA
Carbogen (95% O_2, 5% CO_2):	Fa. Messer/Griesheim
α-D-Glucose:	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin:	Sigma Chemikalien, München
Unisolve I:	Zinsser, Frankfurt 50
Hyaminhydroxid:	New England Nuclear, Boston USA
^{86}Rubidium:	Amersham-Buchler, Braunschweig
(^{125}J)-Insulin:	Isotopendienst West, Sprendlingen
Insulin Radioimmunoassay Kit:	Isotopendienst West
N-2-Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure:	Serva, Heidelberg
Rubidiumchlorid:	Fluka AG, CH-9470 Buchs
Dextran 60:	Serva, Heidelberg
6-(^{14}C) Glucose:	Amersham-Buchler, Braunschweig

Alle anderen, nicht genannten Chemikalien wurden in der jeweils reinsten Form von der Fa. E.Merck, Darmstadt, bezogen.

2.3.2 Eigensynthetisierte Chemikalien

Synthese der DIP-Verbindungen in Anlehnung an die Vorschrift von Kosover et al. (1974):

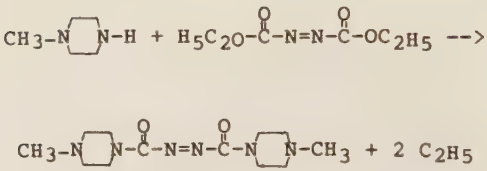
Synthese von DIP (Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid):

22,75 g Methylpiperazin (1 Äquivalent, geringer Überschuß) wurden unter Rühren bei 2 °C langsam zu einer Lösung von 18,9 g Azodicarbonsäurediäthylester (0,5 Äquivalente) in Petrolether/Ether 3:1 getropft. Nach 2-stündigem Rühren wurde der entstandene gelbe Niederschlag abfiltriert, mit absolutem Ether nachgewaschen und

aus n-Hexan/Benzol 1:1 umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 142 °C

Reaktionsablauf:



IR-Spektrum von DIP:

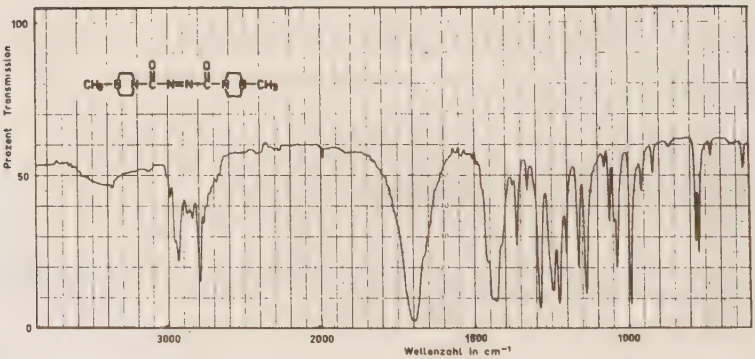


Abb.2-1: IR-Spektrum von DIP

Das Infrarotspektrum von DIP zeigt Banden im Bereich von 2980 cm^{-1} bis 2880 cm^{-1} sowie zwischen 1470 cm^{-1} und 1440 cm^{-1}, die den CH_2-Valenzschwingungen und den CH_2- und CH_3-Deformationsschwingungen zugeordnet werden können. Die Bande bei 2830 cm^{-1} ist charakteristisch für tertiäre Amine, die bei 1710 cm^{-1} für

Carbonylverbindungen.

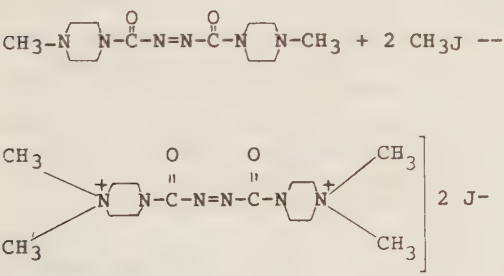
Synthese von DIP-Salz:

3,75 g (1 Äquivalent) DIP und 15 g (4 Äquivalente) Methyljodid als Quaternisierungsmittel wurden getrennt in jeweils doppeltem Volumen Acetonitril gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt, eine Stunde stehengelassen und anschließend noch 30 Minuten unter Rühren auf dem Wasserbad erwärmt. Das quartäre Salz schied sich direkt ab und wurde abgesaugt.

Zur Reinigung wurde das Reaktionsprodukt in möglichst wenig Wasser gelöst und in 99 % Ethanol wieder ausgefällt.

Schmelzpunkt: 262 °C

Reaktionsverlauf:



IR-Spektrum von DIP-Salz:

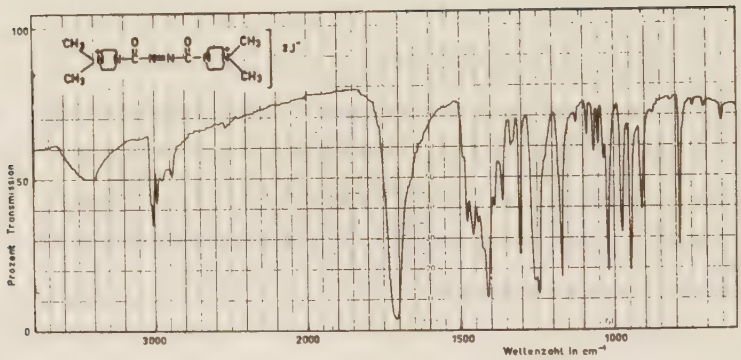


Abb.2-2: IR-Spektrum von DIP-Salz

Die Banden zwischen 3040 cm^{-1} und 2900 cm^{-1} können den CH_3- und CH_2-Valenzschwingungen zugeordnet werden, bei 1710 cm^{-1} erscheint die Carbonylgruppe. Die bei DIP vorhandene ($N-CH_2$)-Bande, charakteristisch für tertiäre Amine, tritt bei DIP-Salz nicht mehr auf. Daraus kann geschlossen werden, daß die Salzbildung am basischen Piperazinstickstoff stattgefunden hat.

Die Haltbarkeit von DIP und DIP-Salz in den Inkubationsmedien über 30 Minuten konnte von Eujen (1979) und Hägele (1981) gezeigt werden.

Um auszuschließen, daß DIP oder DIP-Salz durch Komplexbildung mit Rubidium inaktiviert werden könnten, wurde ein Elektronenspektrum erstellt. Dabei wurden die Spektren folgender Lösungen gegeneinander von 400 nm bis 295 nm gemessen:

a) DIP (DIP-Salz) in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser

b) DIP (DIP-Salz) in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser unter Zusatz von 0,2 mM Rubidiumchlorid.

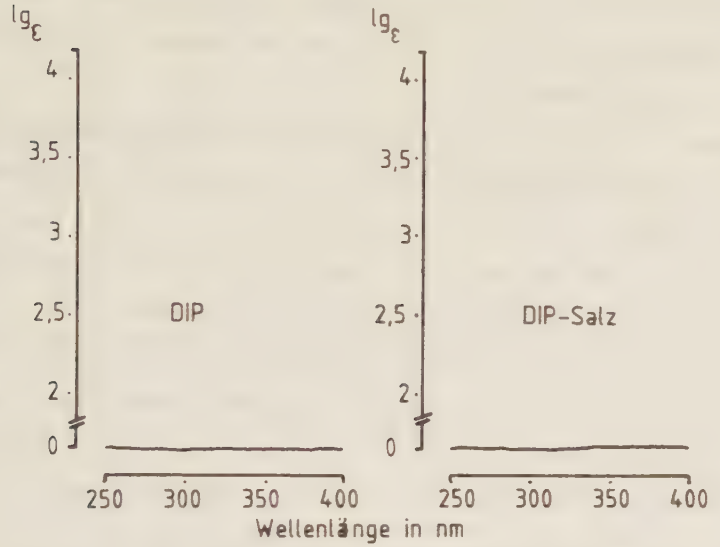


Abb.2-3: Bestimmung der Komplexbildungsneigung von DIP und DIP-Salz

Es konnte kein Absorptionsmaximum festgestellt werden.

Hieraus kann geschlossen werden, daß DIP und DIP-Salz mit Rubidiumchlorid keine Komplexe bilden.

Um einer möglichen Zersetzung der Substanzen entgegenzuwirken, wurden diese trocken und unter Lichtabschluß aufbewahrt. Den Perifusionsmedien wurden die Substanzen erst unmittelbar vor dem Zuschalten des Mediums in das System zugesetzt.

2.3.3 Reinigung des Rinderserumalbumins zur Perifusion

Das zur Herstellung der Perifusionslösungen verwendete Rinderserumalbumin (BSA) wurde auf folgende Weise gereinigt:

a) Calciumentfernung: 200 g BSA wurden in 1 Liter dest. Wasser (20 %) gelöst und mit 3,72 g EDTA-Na (20 mM) versetzt über Nacht bei 4 ^{o}C stehengelassen.

b) Dialyse: Die Lösung wurde in Dialyseschläuche eingefüllt und 7 Tage gegen destilliertes Wasser bei 4 ^{o}C dialysiert. Das Wasser wurde nach jeweils 6 Stunden gewechselt.

c) Verdünnung: Das Dialysat wurde auf 2 Liter (10 %) aufgefüllt und in 100 ml Portionen bis zum Gebrauch eingefroren.

Zur Herstellung von 100 ml Perifusionsmedium wurden jeweils 5 ml der 10 %-igen BSA-Lösung zugesetzt. Das entstandene Medium enthielt dann 0,5 % BSA.

2.4 Verwendete Lösungen

2.4.1 Hanks-Lösung

Die verwendete Hanks-Lösung hat die folgende Zusammensetzung (Hanks und Wallace, 1949):

Stammlösung:	NaCl		80,0 g
	KCl		4,0 g
	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$		0,73 g
	KH_2PO_4		0,6 g
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$		2,0 g
	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$		1,85 g
	Aqua dest.	ad	1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde 1 Teil dieser Lösung mit 9 Teilen Wasser verdünnt, mit 3 mM Glucose versetzt, auf 0 °C gekühlt und der pH-Wert auf 7,35 eingestellt.

2.4.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB-Lösung)

a) Lösung für die statischen Versuche

Die verwendete Lösung hat die folgende Zusammensetzung:

Natriumchlorid	118,0 mM
Kaliumchlorid	4,8 mM
Calciumchlorid	2,1 mM
Magnesiumsulfat	1,2 mM
Natriumhydrogencarbonat	25,0 mM
Kaliumhydrogenphosphat	1,2 mM

Damit die Lösung jederzeit schnell in der gewünschten Menge herstellbar war, wurden drei 10-fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt und bei 4 °C vorrätig gehalten. Sie hatten die folgende Zusammensetzung:

Stammlösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4$ .7 H_2O	2,93 g
	Aqua dest.	ad 1000,0 ml
Stammlösung B:	$NaHCO_3$	21,10 g
	Aqua dest.	ad 1000,0 ml
Stammlösung C:	$CaCl_2$ .2 H_2O	3,73 g
	Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Die Stammlösungen wurden wie folgt gemischt:

Stammlösung A:	1 Teil
Stammlösung B:	1 Teil
Stammlösung C:	1 Teil
Aqua dest.:	7 Teile

Je nach Bedarf wurden die entsprechende Glucosemenge sowie weitere Stoffe zugesetzt, temperiert, eventuell mit Carbogen begast und der pH-Wert auf 7,35 eingestellt.

b) Lösung für die Perifusion

Es wurde eine etwas veränderte KRB-Lösung mit der folgenden Zusammensetzung verwendet (Henquin et al., 1982 b):

Natriumchlorid	122,0 mM
Kaliumchlorid	4,7 mM
Calciumchlorid	2,5 mM
Magnesiumchlorid	1,1 mM
Natriumhydrogencarbonat	20,0 mM

Diese Lösung zeichnet sich vor allem durch einfachere Zusammensetzung sowie durch bessere pH-Konstanz bei Begasung mit 5% CO_2 aus. Sie wurde ebenfalls in Form von drei 10-fach konzentrierten Stammlösungen vorrätig gehalten. Die Stammlösungen hatten die

folgende Zusammensetzung:

Stammlösung A:	NaCl		71,3 g
	KCl		3,69 g
	$MgCl_2$ .6 H_2O		2,24 g
	Aqua dest.	ad	1000,0 ml
Stammlösung B:	$CaCl_2$ .2 H_2O		3,67 g
	Aqua dest.	ad	1000,0 ml
Stammlösung C:	$NaHCO_3$		16,8 g
	Aqua dest.	ad	1000,0 ml

Die Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert und bei Bedarf folgendermaßen gemischt:

Stammlösung A:	1 Teil
Stammlösung B:	1 Teil
Stammlösung C:	1 Teil
Aqua dest.:	7 Teile

Der fertigen Mischung wurden Glucose und weitere Stoffe zugesetzt, die Lösungen begast, temperiert und der pH-Wert auf 7,35 eingestellt.

2.4.3 HEPES-Puffer

Ab den Versuchen 4.2.8 wurde die Natriumhydrogencarbonatstammlösung der KRB-Lösung für die Statikversuche (2.4.2 a) durch ein gleiches Volumen Wasser ersetzt. Dem fertigen Medium wurde HEPES zugesetzt, so daß eine Endkonzentration von 20 mM im Medium erreicht wurde. Die so hergestellte KR-HEPES-Lösung wurde nicht begast.

2.5 Inkubationsmedien für die Versuche im statischen System

2.5.1 Medium für die Präparation der Inseln

Als Medium für die Isolierung der Langerhansschen Inseln wurde die unter 2.4.1 beschriebene Hanks-Lösung verwendet. Es wurden pro Ratte 500 ml Lösung benötigt.

2.5.2 Medium für die Vorinkubation

Zur Vorinkubation wurde das folgende Medium verwendet:

KRB-Lösung (s 2.4.2 a)	5,0 ml
α-D-Glucose (entspr. 3 mM)	27,0 mg
Rinderserumalbumin (2 %)	100,0 mg

Das Medium wurde vor dem Versetzen mit Glucose und Albumin für mindestens 30 Minuten mit Carbogen begast. Nach der Fertigstellung wurde der pH-Wert auf 7,35 eingestellt.

2.5.3 Medien für die Hauptinkubation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zur Hauptinkubation verwendeten Medien in den unter 4.3 beschriebenen Versuchen optimiert. Die Gründe hierfür sowie die Art des jeweils verwendeten Mediums sind bei den einzelnen Versuchen extra beschrieben.

Herstellung der Medien:

Die wie unter 2.4.2 a) beschrieben hergestellte KRB-Lösung wurde mindestens 30 Minuten lang mit Carbogen begast. Anschließend wurden die Lösungen mit Glucose und eventuell BSA versetzt und der pH-Wert auf 7,35 eingestellt. Danach wurde die Radioaktivität zugesetzt.

Basismedium I: KRB-Lösung, 2 % Albumingehalt, 3 mM Glucose

Basismedium II: KRB-Lösung, kein Albumin, 3 mM Glucose

Basismedium III: KR-HEPES-Lösung, kein Albumin, 3 mM Glucose

Basismedium IV: KR-HEPES-Lösung, 0,5 % Albumin, 3 mM Glucose

2.5.3.1 Radioaktivitätszugabe

Der Zusatz von radioaktivem ^{86}Rubidium in Form von ^{86}Rubidiumchloridlösung erfolgte erst unmittelbar vor Beginn der Inkubation.

Die Konzentration an ^{86}Rubidium betrug 0,19 mM, die spezifische Aktivität schwankte zwischen 0,2 mCi/mmol und 0,7 mCi/mmol.

Bei den Versuchen zur Perifusion wurden diese Werte ebenfalls eingehalten.

2.5.4 Waschmedien

Die Waschmedien wurden analog zu den Inkubationsmedien hergestellt.

Waschmedium I: KRB-Lösung, 2% Albumin, 3 mM Glucose

Waschmedium II: KRB-Lösung, kein Albumin, 3 mM Glucose

Waschmedium III: KRB-Lösung, kein Albumin, 16,7 mM Glucose

2.5.5 Effluxmedien für die Versuche im statischen System

Es wurden zwei Medien verwendet:

Medium I (3 mM): KRB-Lösung, kein Albumin, 3 mM Glucose

Medium II (16,7 mM): KRB-Lösung, kein Albumin, 16,7 mM Glucose

2.6 Medium für die Versuche im dynamischen System

2.6.1 Effluxmedium für die Perifusion

Zur Perifusion wurde der unter 2.4.2 b) beschriebene KRB-Puffer unter Zusatz von 0,5 % dialysiertem BSA und den je nach Versuch notwendigen Glucosemengen verwendet. Dieses Medium diente als Perifusionsmedium und zum Waschen der Inseln nach der Inkubation. Die benötigte Lösungsmenge (200 ml pro Perifusionskammer) wurde aus den Stammlösungen hergestellt, die erforderliche Glucosemenge zugesetzt und für mindestens 1 Stunde im Wasserbad bei 37 ^{o}C begast. Danach wurde die Albuminlösung zugegeben und der pH-Wert kontrolliert. Eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,35 mit Säure oder Lauge erübrigte sich meistens, da bei ausreichender Begasung und dem vorliegenden Verhältnis CO_2 / HCO_3^- der pH-Wert vom Puffersystem selbst recht genau eingestellt wird.

Die in den Versuchen zu untersuchenden Substanzen wurden in

trockener Form aufbewahrt und erst unmittelbar vor dem Zuschalten gelöst und zupipettiert. Hierzu wurde an der Perifusionsapparatur ein Magnetrührer installiert, um die Lösungen genügend durchmischen zu können.

2.7 Gefäße für die Inkubationsversuche

Zur Durchführung des Versuches wurden die von Hägele (Diss. 1981) beschriebenen Netzgefäße verwendet. Sie wurden folgendermaßen hergestellt:
Einem Polystyrolröhrchen mit einem Durchmesser von 6,5 mm und einer Höhe von 40 mm wurde der Rundboden abgesägt. Dieser wurde durch ein mit Cyanacrylatklebstoff aufgeklebtes, kreisförmiges Nylonnetz mit 6,6 mm Durchmesser und einer lichten Maschenweite von 54 µm ersetzt. Am dem Netz abgewandten Ende des Röhrchens wurde zur Kennzeichnung und zur besseren Handhabung eine Glaskopfstecknadel mittels Tesafilm befestigt.
Zur Versuchsdurchführung wurden die Netzgefäße mit dem Netz nach unten in ein zweites Polystyrolröhrchen mit Rundboden, einem Durchmesser von 12 mm und einer Länge von 37 mm gestellt.

2.8 Apparatur zur Perifusion von Inseln

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J.C.Henquin, Université catholique de Louvain, Brüssel, wurde eine Perifusionsapparatur aus Plexiglas durch unsere Werkstatt hergestellt. Sie besteht im

Abb.2-4: Perifusionsapparatur. Von links: Magnetrührer, Wasserbad für die Vorratsgefäße mit Einhängethermostat, Zentraleinheit, Schlauchpumpe und Fraktionssammler

Abb.2-5: Zentraleinheit. Es sind zu erkennen: der Plexiglaskasten mit den Kammern (eine Kammer offen, eine geschlossen), den Thermostatanschlüssen und den Gewindebolzen sowie die Deckel mit der Ringnut und dem Ableitungsschlauch

wesentlichen aus vier Teilen (Abb.:2-4):

a) der Zentraleinheit mit den zwei Perifusionskammern (Abb.:2-5)

b) dem Schlauchsystem zur Versorgung und Abfuhr der Medien

c) den Vorratsbehältern mit Wasserbad

d) dem Fraktionssammler

zu a): Zentraleinheit

Die Zentraleinheit besteht aus einem quadratischen Plexiglaskasten mit etwa 18 cm Länge, 7 cm Breite und 4 cm Höhe. In der polierten Oberfläche des Quaders befinden sich zwei konische Bohrungen mit einem Wandwinkel von 45 °, einem Durchmesser von etwa 1 cm und einem Volumen von 0,3 ml. Diese bilden die Perifusionskammern zur Aufnahme der Inseln. An der tiefsten Stelle der Bohrungen mündet von unten her ein dünnes Edelstahlrohr, das nach oben verschlossen ist und seitlich, etwa 0,5 mm über dem Kammerboden, 3 runde Öffnungen besitzt. Dieses Röhrchen ragt auf der Unterseite aus der Zentraleinheit, ist mit dem Schlauchsystem verbunden und dient zur Versorgung der Kammer mit dem Perifusat. Durch diese Anordnung der Eintrittsöffnungen für das Perifusat wird eine schnelle und gleichmäßige Durchmischung des Mediums in der Kammer gewährleistet. Ferner befinden sich in der Oberfläche der Zentraleinheit um die Bohrungen (Kammern) herum jeweils vier Gewindebolzen zur Befestigung der Kammerdeckel. Der Plexiglasquader selbst ist innen hohl und wird über zwei Ansätze mit 37 °C warmem Wasser durchströmt.

Auf die Oberfläche der Zentraleinheit wird über jede Kammer ein runder Plexiglasdeckel mit etwa 5 cm Durchmesser und einem zentralen zylindrischen Ansatz zur besseren Handhabung gesetzt. Er

besitzt vier zu den Gewindebolzen fluchtende Bohrungen, so daß der Deckel mittels Flügelmuttern auf der Zentraleinheit befestigt werden kann. Im Zentrum des Deckels und somit genau über dem Zentrum der Kammern befindet sich ein Edelstahlröhrchen zum Ableiten des Effluxmediums. Um dieses Röhrchen herum wurde ein etwa 1,5 mm tiefer konzentrischer Kreis mit einem Außendurchmesser, der dem maximalen Durchmesser der Kammer entspricht, eingefräßt. Diese Kreisnut ist über eine kreuzförmige Nut mit dem Zentralröhrchen verbunden. Dieses Rinnensystem dient der besseren Sammlung des aus der Kammer austretenden Mediums. Bei den Versuchen wird auf die Oberfläche der Zentraleinheit ein Membranfilter aus Cellulosenitrat mit einer Porenweite von 8 µm gelegt, das die Kammer zunächst abschließt. Auf dieses Filter wird nun der Deckel gesetzt, der vor dem Aufsetzen mit einem kreisförmigen Silikonfettstreifen als Dichtung versehen wird.

zu b): Schlauchsystem

Das Schlauchsystem zur Versorgung der Kammern und zur Ableitung des Mediums aus der Kammer besteht aus Teflonschläuchen mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm sowie Pumpenschläuchen mit einem Innendurchmesser von 1,2 mm. Um einen sehr schnellen Wechsel der Medien durchführen zu können, wurden die Zuleitungen zur Kammer über Teflonvierwegeventile der Fa. Latek, Typ PA 875, geführt. Die Positionen 1 und 2 der Ventile sind über Schläuche mit jeweils einem Vorratsgefäß verbunden. Von der Position 4 des Ventils führt ein Schlauch über eine Schlauchpumpe zum Boden der Zentraleinheit, er ist dort mit dem Edelstahlröhrchen verbunden. Von der Position 3 des Ventils führt ein Schlauch zu einem

Flansch mit Lueransatz aus Teflon. Dieser dient in Verbindung mit einer 10 ml Luerspritze zum Ansaugen des Mediums aus den nicht mit der Kammer in Verbindung stehenden Vorratsgefäßen. Hierdurch wird ein luftblasenfreier Wechsel der Perifusionsmedien ermöglicht. Das aus dem Kammerdeckel austretende Edelstahlröhrchen ist wiederum mit einem Teflonschlauch verbunden, der in den Fraktionssammler mündet.

zu c): Vorratsgefäße

Als Vorratsgefäße werden Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 250 ml verwendet. Diese sind mit einem passenden Gummistopfen verschlossen, der von zwei Glasrohren durchbohrt ist. Eines dieser Rohre ragt etwa 1,5 cm in das Innere des Kolbens, es dient der Entlüftung des Innenraumes und somit dem Druckausgleich. Das zweite Röhrchen reicht bis auf den Boden des Kolbens, in seinem Inneren befinden sich zwei Teflonschläuche, die ebenfalls bis auf den Boden des Erlenmeyerkolbens reichen. Der eine dieser Schläuche ist mit der Position 1 des Vierwegeventiles verbunden, über ihn wird das Medium entnommen, der andere ist über eine Gaswaschflasche mit einer Carbogenflasche verbunden, er dient zur ständigen Begasung des Mediums im Vorratsgefäß. Die Vorratsgefäße sind individuell gekennzeichnet, sie werden durch Federklammern in einem Wasserbad festgehalten und dort durch einen Einhängethermostaten auf 37 ^{o}C temperiert. Der Einhängethermostat ist darüber hinaus mit dem Innenraum der Zentraleinheit verbunden und erwärmt diese nach dem Umwälzprinzip ebenfalls.

zu d): Fraktionssammler

Um das aus der Kammer austretende Effluat in zeitlich begrenzten

Fraktionen (in der Regel 2 Minuten) über längere Zeit sammeln zu können, sind die von den Kammern wegführenden Schläuche mit einem Fraktionssammler verbunden. Als Fraktionssammler wird ein Gerät vom Typ LKB Ultrorac II 2070 verwendet, mit dem das Effluat von zwei Kammern zeitgleich gesammelt werden kann. Als Auffanggefäße dienen Mikrovials der Fa. Zinsser, die danach direkt zur Messung im ß-Counter benutzt werden.

Die "flow rate" des Perifusates wurde über die Schlauchpumpe auf etwa 1,2 ml pro Minute eingestellt, die Totzeit betrug etwa 70 Sekunden, das gesamte Totvolumen etwa 1,4 ml. Da diese Daten für alle vier zur Verfügung stehenden Kammern gleich waren, wurden sie bei der Auswertung der Versuche unberücksichtigt gelassen. Die Apparaturen waren als Doppelkammersysteme konstruiert, das heißt, in jeder Zentraleinheit befanden sich zwei Kammern, in einem Wasserbad waren 2x2 Kolben befestigt, und zu jeder Kammer war das notwendige Schlauchsystem mit Ventil vorhanden. Dazu wurde pro Doppelkammer ein Fraktionssammler vom oben beschriebenen Typ benötigt.

3 Methode

3.1 Methoden anderer Arbeitsgruppen

Zur Untersuchung des Kaliumstoffwechsels von Zellen dienen vor allem die Methoden zur Messung der Kaliumaufnahme sowie zur Bestimmung des Kaliumeffluxes.

3.1.1 Methoden zur Bestimmung der Kaliumaufnahme

Zur Messung der Aufnahme von Kalium in die Langerhanssche Insel sind verschiedene Methoden beschrieben. Boschero et al. (1977) bestimmten den Kaliumgehalt der Langerhansschen Inseln direkt mittels Atomabsorption sowie durch Verwendung von radioaktivem ^{42}Kalium nach Inkubation und Gleichgewichtseinstellung in einem radioaktiven Medium.

Sehlin und Täljedahl (1974) beschrieben eine Methode, bei der das Kalium durch radioaktives ^{86}Rubidium ersetzt wurde. Hierbei wird durch Inkubation in einem radioaktives Rubidium enthaltenden Medium das intrazelluläre Kalium teilweise gegen ^{86}Rubidium ausgetauscht. Dieser Ersatz von Kalium durch Rubidium ist auch an anderen Zellen beschrieben (Bonting, 1970) und erlaubt qualitative Schlüsse auf den Kaliumstoffwechsel der Zelle. Direkte quantitative Vergleiche, vor allem bezüglich der Kinetik von Vorgängen, sind jedoch aufgrund der durch den Ionenradius bedingten unterschiedlichen Membranpermeationsgeschwindigkeiten (Henquin, 1979; Gwirtsmann et al., 1980) nicht ohne weiteres möglich.

Diese Methode wurde von Boschero und Malaisse (1979), Carpinelli und Malaisse (1980), Henquin (1977, 1978) sowie Malaisse et al. (1978) übernommen und modifiziert. Die von Sehlin und Täljedahl (1974) zunächst beschriebene Methode und die nachfolgenden Varianten unterscheiden sich vor allem durch die Zusammensetzung der Medien, die Spezies der verwendeten Tiere, die Methode zur Gewinnung der Inseln sowie durch unterschiedliche Inkubationsmedien (siehe Tab.3-1).

Autor	Tiere	Isolierungs-methode	Inkubationsmedien
Sehlin u. Täljedahl 1974	ob/ob Mäuse -	Microdissection	KRB-Lösung 3 mM Glucose kein Albumin 0,07 mM Rb
Malaisse et al. 1970, 1978	- weibl. Albino Ratte	Collagenase-verfahren nach Lacy (1967)	KRB-Lösung 2,8 mM Glucose 0,5 % BSA 0,2 mM Rb
Henquin 1977	Wistar Ratte männl.	Collagenase-verdauung nach Pilocarpin-vorbehandlung	KRB-Lösung 2,8 mM Glucose 0,5 % BSA 0,2 mM Rb
Carpinelli u. Malaisse 1980	- weibl. Ratte	Collagenase-verfahren nach Lacy (1964)	KRB-Lösung 16,7 mM Glucose 0,5 % BSA 0,6 mM Rb

Tab.3-1: Vergleich der in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen zur Messung der Kaliumpermeabilität der Langerhansschen Inseln

3.1.2 Methoden zur Bestimmung des Kaliumeffluxes

Bei allen in der Literatur beschriebenen Methoden werden die Inseln zunächst mit radioaktivem ^{86}Rubidium als Tracer für Kalium

beladen. Danach wird die Abgabe des so markierten Kaliums entweder dynamisch durch Perifusion der Inseln und Bestimmung des Rubidiums im Effluat (Henquin 1977, 1978) oder statisch durch Inkubation in einem Effluxmedium und Messung des Inselrestgehaltes oder der abgegebenen Radioaktivität im Aussenmedium (Sehlin und Täljedahl, 1974) bestimmt. Der Vorteil der statischen Methode ist der einfachere Versuchsaufbau. Die Perifusionsmethode zeichnet sich vor allem durch die Möglichkeit der Beobachtung von dynamischen Veränderungen sowie dadurch aus, daß durch Wechsel des Perifusionsmediums während der Perifusion die direkte Auswirkung der Untersuchungssubstanz beobachtet werden kann (siehe Tab.3-2).

	Sehlin und Täljedahl 1974	Henquin 1977/78
Tiere	ob/ob Mäuse	Wistar Ratten
Isolierungs-methode	Microdissection	Collagenase
Vorinkubation	30 min	nein
Beladen der Inseln:		
Dauer	120 min	90 min
Menge Rubidium	0,07 mM Rb	0,2 mM Rb
Waschen:		
Dauer	2 sec	-
Häufigkeit	-	3 mal
Effluxmessung:		
Prinzip	statisch Inkubation	dynamisch Perifusion
Dauer	10 min	70 min
Umschalt-möglichkeit	nein	ja, beliebig oft

Tab.3-2: Vergleich der Methoden zur Effluxmessung

3.2 Auswahlkriterien

Als Hauptkriterium für die Auswahl der geeigneten Versuchsbedingungen war zunächst die Vergleichbarkeit mit den in unserem Arbeitskreis bereits durchgeführten Untersuchungen anderer Parameter an Langerhansschen Inseln gefordert. Darüber hinaus sollte auf bereits bestehende Techniken bezüglich der Inkubations-Methode zurückgegriffen werden.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde zur Isolierung der erforderlichen Langerhansschen Inseln das Collagenaseverfahren, modifiziert nach Lacy und Kostianovsky (1967), ausgewählt. Dieses Verfahren gewährleistet eine relativ schnelle und vollständige Trennung der Inseln vom exokrinen Pankreasgewebe. Als Inkubationsgefäße wurden die von Hägele (1981) beschriebenen Netzgefäße verwendet, die eine gute Manipulierbarkeit der Inselgruppen versprachen und einfach herzustellen waren. Die Zusammensetzung der Medien wurde im Rahmen der Arbeit variiert und den Erfordernissen angepaßt.

Zur Messung des Rubidiumeffluxes sollte nun zunächst versucht werden, entsprechend der von Sehlin und Täljedahl (1974) beschriebenen Anordnung, mit den bei uns von Hägele (1981) eingeführten Netzgefäßen eine statische Versuchsanordnung zu erstellen. Diese sollte sich durch einfachen Aufbau und eine eventuelle direkte Vergleichbarkeit mit anderen, im gleichen Inkubationssystem durchgeführten Versuchen auszeichnen.

3.3 Versuchsablauf

3.3.1 Isolierung der Langerhansschen Inseln für die Versuche im statischen System

Die Isolierung der Inseln erfolgte in Anlehnung an die von Lacy und Kostianovsky (1967) beschriebene Methode der Verdauung mittels Collagenase.

Ratten beiderlei Geschlechtes wurden mit Ether narkotisiert. Das Abdomen wurde durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und zwei Querschnitte entlang der Rippenbögen eröffnet. Das unter dem Leberlappen gelegene Stück des Duodenums wurde mit einer Pinzette hervorgezogen. Dabei wurde der Ductus pancreaticus etwas angespannt und dadurch deutlich sichtbar. Der Ductus pancreaticus wurde zur Leber hin mit einem Faden abgebunden. Nach Abklemmen des Duodenums in Richtung Magen wurde vom Darmlumen aus eine Kanüle in den Ductus pancreaticus gesetzt und durch diese 10 ml eiskalter Hanks-Lösung injiziert. Dabei wurde das Pankreas aufgebläht, das Gewebe zerrissen und deutlich sichtbar. Mit einer kleinen Schere wurde das Pankreas von Milz, Magen, Darm und Leber losgeschnitten und in eine zum Teil mit eiskalter Hanks-Lösung gefüllte Petrischale überführt. Dort wurden alle anhaftenden Fremdpartikel entfernt. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Schere so klein geschnitten, daß es durch den Konus einer 5 ml Rekordspritze aufgesaugt werden konnte. Nach Absitzen der Partikel wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt.

Je nach Masse der gewonnenen Pankreata wurden ein oder zwei in ein 20 ml Schnappdeckelgefäß mit 30 mg Collagenase überführt und

schnellstmöglich in ein Schüttelwasserbad gestellt. Bei starkem Schütteln und einer Temperatur von 37 °C mußte die Collagenase so lange auf die Pankreaspartikel einwirken, bis eine homogene, hellbraune und schleimige Flüssigkeit entstanden war. Dies dauerte je nach Aktivität der Collagenase, Masse der Pankreasteilchen und Volumen etwa 7-20 Minuten. Nach dieser Zeit wurde das Gefäß aus dem Wasserbad genommen und sofort mit 7 ml eiskalter Hanks-Lösung verdünnt. Das Gemisch wurde durch eine Rekordspritze aufgesaugt, dabei homogenisiert und durch ein Kunststoffteesieb in eine Vorlage mit 20 ml eiskalter Hanks-Lösung gebracht. Das Gemisch wurde aufgeschüttelt und zum Absitzen der Pankreaspartikel in Eis gestellt. Auf diese Weise konnte durch die starke, plötzliche Temperatursenkung und durch den Verdünnungseffekt die Verdauung schlagartig beendet werden. Durch die größere Dichte der Langerhansschen Inseln im Vergleich zu den noch vorhandenen Partikeln des exokrinen Pankreas sedimentieren die Inseln schneller und können durch eine Pipette aufgesaugt und damit isoliert werden. Dieser Vorgang wurde ebenfalls unter Eiskühlung durchgeführt.

3.3.1.1 Inselisolierung für die Perifusion

Aufgrund der bei den Versuchen im statischen System gewonnenen Erfahrungen sowie der Anforderungen an die Qualität der in der Perifusion zu untersuchenden Inseln, vor allem bezüglich ihrer uneingeschränkten Funktionstüchtigkeit, wurde die Methode zur Isolierung der Inseln weiter modifiziert. Hierbei wurden drei

Parameter geändert:

1) Es wurde bei der gesamten Isolierung, außer der Verdauungsphase, bei Raumtemperatur und nicht unter Eiskühlung gearbeitet.

2) Als Medium zur Isolierung der Inseln wurde KRB-Lösung (2.4.2 b) unter Zusatz von 3 mM Glucose und 0,5 % Albumin verwendet. Die Hanks-Lösung entfiel.

3) Zur besseren Beendigung der Verdauung und zur Trennung von Collagenase und weiteren löslichen oder schleimigen Bestandteilen von den freigesetzten Inseln wurde das Verdauungsgemisch nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbad verdünnt und sofort für etwa 5-7 Sekunden zentrifugiert. Nach schnellem Abbremsen der Zentrifuge wurde der Überstand verworfen, das Sediment in KRB-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Die so gewonnenen Inseln zeichneten sich durch größere Reinheit, einheitlichere Größe und relativ konstante Anzahl aus. Auch vereinfachte sich der Auslesevorgang deutlich. Für die Perifusion wurden nur Inseln ohne anhaftendes exokrines Gewebe und von annähernd einheitlicher Größe verwendet.

3.3.2 Vorinkubation

Die Vorinkubation hat die Aufgabe, den Stoffwechsel der Insel nach dem Isolierungsvorgang zu regenerieren. Die von exokrinen Partikeln befreiten Langerhansschen Inseln wurden mit etwas Hanks-Lösung in ein 5 ml Schnappdeckelgefäß überführt. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und 2 ml Vorinkubationsmedium

(2.5.2) zugegeben. Die Inseln wurden bei 37 °C und Carbogenbegasung 30 Minuten unter mäßigem Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium dekantiert und die Inseln in kalte Hanks-Lösung überführt.

Die Vorinkubation wurde nur bei den Versuchen zur Inkubation sowie zur statischen Effluxmessung durchgeführt, nicht jedoch bei der Perifusion.

3.3.3 Hauptinkubation

Die Hauptinkubation dient zur Beladung der Langerhansschen Inseln mit ^{86}Rubidium. In den hier beschriebenen Versuchen zur Rubidiumaufnahme (4.1 - 4.2.9) wurde die Dauer der Inkubation zunächst von 1 bis 180 Minuten variiert, um die für die Einstellung eines Gleichgewichtes notwendige Zeit zu ermitteln.

Jeweils 20 Inseln wurden von oben mit einer Pipette und etwas Hanks-Lösung in die unter 2.6 beschriebenen Netzgefäße einpipettiert. Das überstehende Medium wurde durch Aufsetzen des Netzgefäßes auf ein Kleenextuch abgesaugt und danach in ein Rundbodengefäß gestellt. Zur Durchführung der Hauptinkubation wurden nun 0,7 ml Inkubationsmedium von oben zum Teil in das Netzgefäß und zum Teil in das äußere Rundbodengefäß pipettiert. Die beiden Gefäße wurden nun in ein Schüttelwasserbad mit 37 °C und etwa 40 kreisförmigen Bewegungen pro Minute unter eine Plexiglasglocke gestellt und unter Carbogenbegasung inkubiert. Ab Versuch 4.2.8 wurde auf die Begasung verzichtet.

Bei den unter 4.3.1 beschriebenen Versuchen zur statischen Ef-

fluxmessung wurde eine Inkubationsdauer von 30 Minuten, bei den übrigen statischen Effluxversuchen von 90 Minuten gewählt.

3.3.4 Waschvorgang

Nach Beendigung der Hauptinkubation wurden die Netzgefäße aus dem Medium herausgenommen, die überstehende Flüssigkeit durch Aufstellen auf ein Kleenextuch abgesaugt und, bei den Versuchen zur Rubidiumaufnahme, die Inseln durch zweimaliges Einpipettieren in das Netzgefäß und anschließendes Absaugen von je 0,5 ml Waschmedium von anhaftendem Hauptinkubationsmedium gereinigt.
Bei den Versuchen zur Effluxmessung ist das Waschverfahren gesondert beschrieben.

3.3.5 Messung des Rubidiumgehaltes

Das Netz mit den darauf haftenden Inseln (Hägele, 1981) wurde mit einer Pinzette vom Trägerröhrchen abgelöst und in ein Szintillationsgefäß überführt. Dort wurden 20 µl Hyamin auf das Netz aufgetropft und so das Inselgewebe aufgelöst. Nach 10 Minuten wurden 16 ml Unisolve I-Lösung als Szintillationscoctail zugegeben und durch 8 maliges Hin- und Herschütteln das aus der zerstörten Insel freigesetzte radioaktive Rubidium gleichmäßig verteilt. Nach Absitzen des Netzes wurde der Überstand dekantiert und für 12 Stunden zur Stabilisierung in den thermostatierten ß-Szintillationszähler gestellt. Danach wurden die Proben 1 Minute

lang gezählt.

3.3.6 Auswertung der Messergebnisse

^{86}Rubidium zerfällt mit einer Halbwertszeit von 18 Tagen. Um die dadurch verursachte tägliche Verminderung der Countzahlen sowie individuelle Schwankungen bei der Herstellung der Inkubationsmedien auszugleichen, wurde bei jedem Versuch ein Standard, bestehend aus 10 µl Inkubationslösung und 16 ml Szintillationscoctail, mitgemessen. Aus der bekannten Konzentration im Standard und der von diesem erhaltenen Countzahl wurde über die Countzahlen der einzelnen Proben der Gehalt an ^{86}Rubidium errechnet:

$$\frac{\text{Konzentration im Standard}}{\text{Standardcountzahl}} \times \text{Probencountzahl} = \text{Gehalt der Probe}$$

Zur schnelleren und sicheren Durchführung der Berechnungen wurde ein Computerprogramm erstellt, das im Anhang aufgelistet ist.

3.3.7 Bestimmung der Effluxrate im statischen System

Nachdem es durch die Versuche zur Rubidiumaufnahme möglich war, Langerhanssche Inseln bis zur Einstellung eines Gleichgewichtszustandes mit ^{86}Rubidium zu beladen, sollte nun versucht werden, eine Messung der Rubidiumeffluxrate im statischen System zu entwickeln. Hierfür boten sich zwei Wege an:

a) die Bestimmung des von der Insel freigesetzten Rubidiums direkt im Aussenmedium (sog. Aussenmediummethode)

b) die Bestimmung über den unterschiedlichen Inselgehalt vor und nach der Effluxphase durch direkte Gehaltsbestimmung in der Insel (sog. Inselrestmethode)

Nähere Einzelheiten sind im Rahmen der methodischen Versuchsergebnisse unter 4.3 beschrieben.

3.4 Perifusion von Inseln

Da die Messung von Effluxraten in einem statischen Versuchssystem nicht zu befriedigenden Ergebnissen führte, wurde eine dynamische Messmethode in Form der Perifusion von isolierten Inseln installiert (Henquin, 1977, 1978).

Je 40 isolierte Langerhanssche Inseln (s.3.3.1.1) wurden nach dem Auslesen in ein Reagenzglas mit sehr wenig KRB-Lösung einpipettiert. Der Überstand wurde abgesaugt und durch 250 µl Effluxmedium mit 3 mM Glucose ersetzt. Danach wurde die radioaktive ^{86}Rubidiumchloridlösung zugegeben. Die Menge der Aktivitätszugabe wurde je nach Beladung und Konzentration des Rubidiums so gewählt, daß im Inkubationsmedium eine Konzentration von 0,2 mM erreicht wurde. Das Reagenzglas wurde sodann etwa 2 Minuten lang mit Carbogen begast, mit einem Stopfen verschlossen und für 90 Minuten zur Inkubation in ein Schüttelwasserbad mit 37 ^{o}C und etwa 40 U/min gestellt.

Während der Inkubationsphase wurde die Perifusionsapparatur vorbereitet. Der Wasserthermostat wurde zwecks Vortemperierung des Systems eingeschaltet, die Deckel mit einem dünnen Streifen aus hochviskosem Silikonfett zur Dichtung versehen und die Membran-

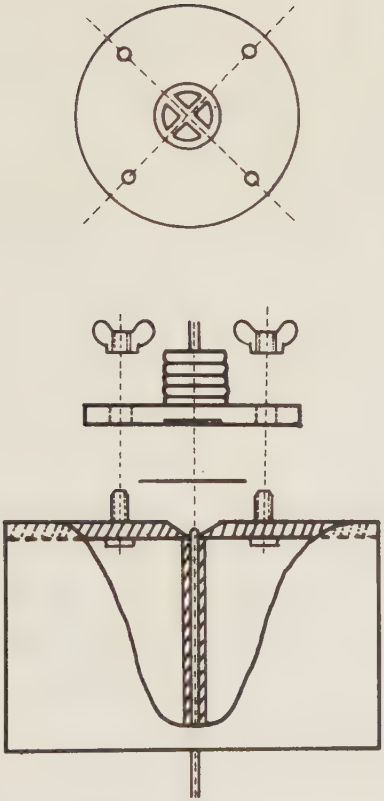


Abb.3-1: Zentraleinheit mit Kammer, Membranfilter und Deckel

filter bereitgelegt. Nach der Herstellung der Perifusionsmedien wurden diese in das Wasserbad gestellt und über die in die Stopfen eingebauten Versorgungsschläuche an die Begasung und die Ventile angeschlossen. Durch Ansaugen der Medien mittels der an die Ventile angebauten Spritzen, Einschalten der Pumpe und mehrfaches Umschalten der Ventile konnten Luftblasen aus dem Schlauchsystem entfernt werden, die sonst beim Umschalten der Medien in die Kammern gelangt wären und in den folgenden Fraktionen unnormal erhöhte Countzahlen erzeugt hätten. Die Pumpe wurde nun bis zum Beginn der Perifusion wieder abgestellt, die Begasung der Vorratsgefäße und die Temperierung des Systems jedoch fortgesetzt.

Nach der Inkubation (Aufladephase) wurde das Reagenzglas aus dem Wasserbad genommen und der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Die Inseln wurden sodann durch dreimaliges Einpipettieren von etwa 2 ml KRB-Lösung mit 0,5 % Albumin und 3 mM Glucose und anschließendes Absaugen des Überstandes gewaschen. Die Inseln und der Pufferrest wurden auf eine schwarze Petrischale überführt, dort der Pufferrest weitgehend entfernt und die Inseln in einer Pipette in die Kammer überführt. Auf die Kammer wurde ein Membranfilter gelegt, der Deckel aufgesetzt und festgeschraubt und damit das System verschlossen (siehe Abb. 3-1). Durch Einschalten der Pumpe wurde die Perifusion gestartet. Waschung und Überführung der Inseln bis zum Start der Perifusion dauerten etwa 11 Minuten.

Die Perifusion selbst wird in vier Phasen unterteilt:

1) die Equilibrierungsphase: Sie beginnt mit dem ersten Waschvor-

gang und dauert 20 Minuten. In dieser Zeitspanne werden die Inseln aus dem Inkubationsmedium in die Kammer transferiert und das Perifusionssystem gestartet. Das in dieser Zeitspanne anfallende Effluat wurde verworfen.

2) die Vorphase: Nach der Equilibrierungsphase wurde der Fraktionssammler angeschaltet und das Effluat in 2-Minuten-Fraktionen gesammelt. Die Vorphase dauerte 20 Minuten, also 10 Fraktionen, und diente ebenfalls zur Equilibrierung und Stabilisierung der Effluxrate im in der Regel nichtstimulierten System. Während der letzten beiden Fraktionen der Vorphase, also zwischen der 16. und der 20. Minute der Perifusion wurden die zu untersuchenden Substanzen in die mit Medium gefüllten Vorratsgefäße für die Stimulationsphase (Phase 3) gegeben und unter Rühren auf einem Magnetrührer gelöst. 15 Sekunden vor dem Ende der Vorphase wurde das Medium für die Stimulationsphase mit einer Spritze über den Luerkonus des Schlauchsystemes durch die Ventile und das Schlauchsystem angesaugt und somit abgestandenes Medium aus den Schläuchen entfernt und diese luftblasenfrei gefüllt.

3) die Stimulationsphase: Nach Beendigung der Vorphase, d.h. nach Ende der 20. Minute wurde zeitgleich mit dem Fraktionswechsel durch Umschalten der Vierwegeventile das Perifusionsmedium gewechselt und das System an das Vorratsgefäß für die Stimulationsphase angeschaltet. Die Stimulationsphase dauerte 30 Minuten und diente zur Beobachtung eventueller Veränderungen des Rubidiumeffluxes im vorgegebenen System durch die zu untersuchenden Substanzen. 15 Sekunden vor dem Ende der Stimulationsphase wurde nun das Medium der Vorphase, wie oben beschrieben, erneut angesaugt und so der erneute Wechsel des Perifusates vorbereitet.

4) der Nachlauf: Nach dem Ende der 50. Minute wurde nun erneut das Vorphasenmedium zugeschaltet. Dies diente dazu, eine eventuelle Reversibilität der gefundenen Effekte zeigen zu können. Der Nachlauf dauerte ebenfalls 20 Minuten, es wurden also erneut 10 Fraktionen gesammelt.

Nach dem Ende des Nachlaufes wurde die Perifusion sofort gestoppt. Die Kammern wurden geöffnet, Filter und Inseln in getrennte Szintillationsgefäße überführt. Alle Probengefäße wurden mit etwa 2,5 ml Unisolve I-Lösung aufgefüllt, geschüttelt und für etwa 2 Stunden zur Temperierung und zum Abklingen der Chemolumineszenz in den Liquid Scintillation Counter eingestellt. Danach wurden die Proben im ^{32}P-Kanal bei offenem Fenster und einer Verstärkung von 2% bei einer Wiederfindungsrate von 85 % für 5 Minuten gezählt. Das eventuelle Auftreten von Quencheffekten wurde durch Vergleich der Wiederfindungsrate mit der eines inneren Standards kontrolliert. Es konnten bei den hier beschriebenen Versuchen keine Quencheffekte festgestellt werden.

Die Perifusionsapparatur wurde zur Reinigung etwa 20 Minuten lang mit destilliertem Wasser durchspült. Danach konnte im Effluat keine messbare Radioaktivität mehr festgestellt werden.

3.4.1 Berechnung der Effluxrate

Zur Auswertung der Versuche wurde die Effluxrate bestimmt. Diese berechnet sich aus dem in der Zeiteinheit durch die Inselgruppe freigesetzten Rubidium sowie dem Rubidiumgehalt der Inselgruppe zu Beginn dieser Zeiteinheit. Da eine Gehaltsbestimmung alle 2

Minuten ohne Zerstörung der Inseln nicht möglich ist, wird nach Beendigung der Perifusion der Restgehalt der Inselgruppe bestimmt und der jeweilige Inselgehalt zu Beginn der Effluxphase zurückgerechnet.
Die Effluxrate berechnet sich dann wie folgt:

$$\frac{\text{Countzahl der Fraktion}}{\text{Inselcountzahl + Filtercountzahl + Fraktionscountzahl}} = \text{Rate}$$

Es wird mit der Berechnung bei der letzten gesammelten Fraktion begonnen und die Countzahlen im Nenner der Formel jeweils aufsummiert und für die Berechnung der nächsten Fraktion mitübernommen. Es ergeben sich im Regelfall bei 35 gesammelten Fraktionen Raten von etwa 1 - 3,5 % . Die obige Gleichung ist von der Anzahl sowie der Gesamtaufnahme der Inseln unabhängig.
Die gefundenen Raten werden in ein Schaubild übertragen.

3.4.2 Auswertung der Effekte

Bei der gewählten Art der Ergebnisdarstellung waren die erzielten Effekte optisch deutlich sichtbar. Dennoch wurde eine rechnerische Auswertung durchgeführt. Hierzu wurden Maßzahlen für die Raten in der Vorphase und in der Stimulationsphase errechnet und miteinander verglichen, um eine Aussage über die durch die Untersuchungssubstanzen ausgelösten Effekte machen zu können. Dazu wurde der Mittelwert (I) der Fraktionen 8, 9 und 10, also der drei Fraktionen unmittelbar vor dem Zuschalten der Untersuchungssubstanzen, und der Mittelwert (II) der Fraktionen 19, 20 und 21,

drei Fraktionen im Mittelteil der Stimulationsphase, berechnet.
a) Es wurde dann die Differenz aus dem Mittelwert (I) minus dem Mittelwert (II) berechnet. Da diese Differenz unter Umständen durch die Lage der Kurve im Koordinatensystem beeinflußt sein konnte, wurde ein Differenzenquotient aus der Differenz geteilt durch den Mittelwert (I) gebildet.
b) Aus Vergleichsgründen wurde aus dem Mittelwert (II) geteilt durch den Mittelwert (I) ebenfalls ein Quotient gebildet.

Zur statistischen Absicherung der Effekte, beziehungsweise zur Bestätigung der Nullhypothese bei den Ergebnissen ohne statistisch signifikante Unterschiede, wurde eine Varianzanalyse mit anschließendem t-Test bei zweiseitiger Fragestellung und unverbundenen Proben mit den berechneten Quotienten durchgeführt.

3.4.3 Durchführung der Berechnungen

Die Berechnung der Effluxrate sowie der Mittelwerte und der beschriebenen Quotienten und das Zeichnen des Schaubildes wurden durch ein im Rahmen dieser Arbeit erstelltes Rechenprogramm auf einem Apple II Europlus mit angeschlossenem Daisy-wheel printer ausgeführt. Die berechneten Daten der einzelnen Versuche wurden auf Diskette gespeichert.
Zur statistischen Auswertung wurden die Einzeldaten durch ein weiteres, im Rahmen dieser Arbeit erstelltes Rechenprogramm von der Diskette gelesen und aus den Einzeldaten die Mittelwerte sowie SD und SEM berechnet. Aus diesen Versuchsmittelwerten wur-

den vom Programm Kurven gezeichnet, die bei den Versuchsergebnissen aufgezeigt sind. Das Listing des Programmes befindet sich im Anhang.
Die anschließende Varianzanalyse der Quotientenmittelwerte wurde mit einem Taschenrechner manuell durchgeführt.

3.5 Insulinbestimmung im statischen System

Bei einigen Versuchen wurde die Insulinsekretion der Inseln bestimmt. Hierbei wurden jedoch nur jeweils 5 Inseln pro Netzgefäß eingesetzt. Die Bestimmung der sezernierten Insulinmenge wurde durch Radioimmunoassay (Doppelantikörpermethode nach Soeldner und Slone, 1965) mit dem INSIKR-Kit in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Eichkurve wurde mit Ratteninsulin erstellt.

3.5.1 Durchführung der Bestimmung

Da der Insulingehalt der Proben im statischen System für eine direkte Bestimmung zu hoch ist, wurden 0,1 ml des Probenvolumens mit 0,9 ml Puffer der folgenden Zusammensetzung verdünnt:

$NaH_2pO_4 \cdot H_2O$		550 mg
Rinderserumalbumin		100 mg
Aqua dest.	ad	100 ml

Der pH-Wert dieses Puffers wurde mit NaOH auf 7,35 eingestellt. Von den auf diese Weise erhaltenen Proben (Volumen 1 ml) wurden wiederum 0,1 ml für die Bestimmung eingesetzt. Die Verdünnungsreihe der Eichkurve (0 bis 15 µl Insulin / 0,1 ml) wurde ebenso

behandelt. Der Leerwert bestand aus 0,1 ml des oben beschriebenen Puffers.

Der lyophilisierte Antikörper wurde gemäß der Vorschrift gelöst, jeweils 100 µl wurden zu den Proben gegeben und diese nach sorgfältigem Durchmischen 6 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Zugabe des gelösten ^{125}J-markierten Insulins (100 µl) wurden die Proben 18 Stunden lang im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 1 ml Puffer verdünnt und 20 Minuten lang mit 3500 U/min bei 4 ^{o}C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und restliche, am Gefäß anhaftende Radioaktivitätstropfen mittels einer Wasserstrahlpumpe und einer Kanüle abgesaugt. Die Proben wurden anschließend in einem automatischen Gamma-Counter gemessen. Hierbei wurde die Zähldauer so eingestellt, daß diejenige Probe, die ausschließlich radioaktiv markiertes Insulin enthielt, mehr als 6000 counts aufwies. Mit der auf diese Weise festgelegten Meßzeit, meist 1 Minute, wurden alle Proben des Ansatzes gemessen.

3.5.2 Berechnung der Insulinmenge

Nach Bildung des Mittelwertes aus den Doppelbestimmungen wurden die Durchschnittswerte als Prozentsatz des Nullwertes der Eichkurve ausgedrückt. Der Insulingehalt der Proben konnte nun entweder aus der Eichkurve abgelesen oder mit Hilfe eines vorhandenen Rechenprogrammes bestimmt werden.

3.5.3 Insulinbestimmung in der Perifusion

Um Aussagen über die Funktionstüchtigkeit des gewählten Perifusionssystemes machen zu können, wurde die Insulinsekretion nach Stimulation der Inseln mit 16,7 mM Glucose gemessen.

Die nach der für die Perifusion optimierten Methode isolierten Inseln wurden 30 Minuten lang bei 37 °C in KRB-Lösung mit 0,5 % BSA und 3 mM Glucose unter Carbogenbegasung vorinkubiert. Danach wurden in jede Perifusionskammer 70 Inseln eingelesen. Zunächst wurde 20 Minuten mit einem 3 mM Glucose enthaltenden Medium vorperifundiert. Die Fraktionen wurden im 4-Minuten-Abstand gewechselt. Zu Beginn der 20. Minute wurde auf ein Medium mit 16,7 mM Glucose umgeschaltet. Es wurden nun über 15 Minuten die Fraktionen im 1-Minuten-Abstand gesammelt. Danach wurde bis zur 90. Minute im 2-Minuten-Abstand weitergesammelt.

Von den so erhaltenen Proben wurden jeweils 100 µl abpipettiert und das darin enthaltene Insulin ohne Verdünnen bestimmt.

4 Ergebnisse des methodischen Teiles

4.1 Bestimmung von ^{86} Rubidium im ß-Szintillationszähler

^{86} Rubidium ist ein starker ß-und γ-Strahler:

^{86} Rb $^{+}$

ß: max. 1,8 MeV
γ: max. 1,077 MeV
Halbwertszeit 18,7 Tage

(aus: Radionukleidkarte Kernforschungszentrum Karlsruhe)

Die Messungen wurden mit einem ß-Szintillationszähler vom Typ PACKARD TRI CARB Mod. 3385 Liquid Scintillation Spectrometer durchgeführt.

4.1.1 Bestimmung des günstigsten Energiebereiches für die Messung von ^{86}Rubidium

Zur Bestimmung des günstigsten Energiebereiches für die Messung von ^{86}Rubidium wurden 5 Proben mit einer bekannten Konzentration an ^{86}Rubidiumchlorid in Wasser hergestellt. Diese Proben wurden in allen Meßkanälen des Counters gemessen. Aus der bekannten Konzentration an radioaktivem Rubidium in den Proben wurden unter Berücksichtigung des Kalibrierungsdatums und der Halbwertszeit die am Meßtag zu erwartenden Countzahlen (dpm) berechnet und mit den tatsächlich gemessenen verglichen.

Es ergaben sich für die einzelnen Kanäle die folgenden Wiederfindungsraten (efficiency):

berechnet:	36035 dpm		
^{3}H-Kanal	1566 +/- 39,6 cpm	entspr.	4,4 %
^{14}C-Kanal	7494 +/- 108,5 cpm	entspr.	20,8 %
^{32}P-Kanal	530 +/- 7,8 cpm	entspr.	1,5 %
Ausschlußkanäle:			
^{3}H ohne ^{14}C	1388 +/- 33,1 cpm	entspr.	3,8 %
^{14}C ohne ^{3}H	5176 +/- 44,9 cpm	entspr.	14,1 %
Messung im ^{32}P-Kanal bei offenem Energiefenster (untere Schwelle bei 50; obere bei 1000; sog. E-F Kanal):			
E-F Kanal	30630 +/- 184,2 cpm	entspr.	84,9 %
	Mean +/- SEM (n=4)		

Tab.4-1: Bestimmung der Wiederfindungsrate von ^{86}Rubidium im ß-Counter

Aufgrund dieser Ergebnisse und da mit nur einem Isotop gearbeitet wurde, konnte ^{86}Rubidium bei offenem Fenster sowie einer Verstärkung von 2 % im beschriebenen ß-Szintillationsmeßgerät mit einer efficiency von 85 % bestimmt werden.

4.1.2 Bestimmung des Quencheffektes

Da bei der Messung der Inselgehalte im Szintillationscoctail außer dem radioaktiven Rubidium und Wasser auch noch Hyamin vorhanden ist, wurde ein eventueller Quencheffekt des Hyamins untersucht. Dazu wurde eine Probenreihe mit steigender Hyaminkonzentration bei gleichbleibender Rubidiumkonzentration erstellt.

Hyamin in 16 ml Unisolve I:

von 0 bis 500 µl / 16 ml

Zählzeit 1 Minute

a) Messung sofort:

von 283329 cpm bis 332018 cpm, Diff. 48689 cpm

b) Messung nach 24 Stunden:

von 278626 cpm bis 337739 cpm, Diff. 59113 cpm

Schwankungen nicht linear

Ein statistisch signifikanter Quencheffekt war nicht sichtbar, deshalb kann Rubidium unter den hier beschriebenen Bedingungen gemessen werden.

4.1.3 Bestimmung von Leerwerten zur Backgroundstandardisierung

Zur Bestimmung des durch die Szintillationsvials, den Coctail sowie Einflüsse der Umgebung entstehenden Backgroundes wurden Leerwerte, die nur Unisolve I (16 ml) enthielten, gemessen:

Unisolve I	cpm	n
16 ml	27 +/- 2,1	5

4.1.4 Bestimmung der Verlustrate beim Dekantieren

Um eine Störung der Messung durch am Netz haftende Restradioaktivität zu vermeiden, wurden die Proben zunächst mit 10 µl Hyamin versetzt und nach 10 Minuten mit 16 ml Unisolve I aufgefüllt. Die Proben wurden geschüttelt und nach dem Absitzen des Netzes dekan-

tiert. Gemessen wurde der Überstand ohne das zurückgebliebene Netz (Hägele, Diss. 1981).

Um eine eventuelle Verringerung der Zählausbeute durch zurückbleibende Tropfen zu bestimmen, wurden Standardwerte mit bekannter Konzentration an Radioaktivität und ohne Netz zunächst gemessen, dann dekantiert und erneut gemessen.

nicht dekantiert:	191672	cpm
dekantiert:	185361	cpm
Differenz	6311	cpm

Verlust in %: 3,29

Tab.4-2: Verluste beim Dekantieren

Diese Verlustrate liegt innerhalb der Meßtoleranzen. Dennoch wurden die bei den einzelnen Serien mitgemessenen Standardwerte ebenfalls dekantiert.

4.1.5 Leernetzinkubation

Zur Bestimmung der durch die Netze in die Proben eingeschleppten Radioaktivität wurden Netze ohne Inselmaterial (Leernetze) 60 Minuten im Hauptinkubationsmedium inkubiert und wie die übrigen Proben behandelt. Die gefundenen Countzahlen dieser Proben stellten ein weiteres Maß für den versuchsspezifischen Background dar. Die Ergebnisse sind unter 4.2.2 beschrieben.

4.2 Erstellen einer Aufnahmekurve

Zunächst wurde versucht, mit dem unter 3.3. beschriebenen Verfahren die zeitliche Abhängigkeit der Aufnahme von ^{86}Rubidium in die Langerhansschen Inseln in einer Kurve zu beschreiben.
Sehlin und Täljedahl (1974) untersuchten diesen Parameter für die Inseln von ob/ob Mäusen, Malaisse et al. (1978) für die Inseln von weiblichen Albinoratten. Hierbei stellte sich nach etwa 60 Minuten (Malaisse) bzw. 120 Minuten (Sehlin) ein Gleichgewichtszustand ein.

4.2.1 Aufnahmeversuch I

Als Medium für die Hauptinkubation wurde zunächst das Basismedium I gewählt (KRB-Lsg., 2% BSA, 3 mM Glucose). Die Konzentration an radioaktivem Rubidium war 0,19 mM.
Die Dauer der Inkubation wurde von 0 bis 120 Minuten variiert.

Zeit in min	Gehalt in pmol/Insel Mittelwert	Streuung von	bis
0	0,260	0,257	0,263
10	0,949	0,639	1,404
30	0,603	0,531	0,872
60	1,050	0,770	1,580
90	0,723	0,480	1,125
120	0,791	0,593	0,990
Leernetze	0,380	0,025	0,763

n=3 (Versuche)

Tab. 4-3: Aufnahme von ^{86}Rb durch Inseln in Abhängigkeit von der Zeit. Versuch I

Bei diesen Versuchen unterlagen die Ergebnisse einer starken und uneinheitlichen Streuung, eine zeichnerische Auswertung war des-

halb nicht sinnvoll.

Auffällig an diesen Ergebnissen ist vor allem die starke Streuung des "Gehaltes" der Leernetze, die über 60 Minuten inkubiert wurden. Offensichtlich wird Radioaktivität unspezifisch an die Oberfläche der Netze adsorbiert und in den Szintillationscoctail abgegeben. Diese Radioaktivität läßt sich durch das praktizierte Waschverfahren nicht genügend entfernen, so daß sich keine einheitlichen Backgroundwerte ergeben.

Darüber hinaus besteht die Wahrscheinlichkeit, daß durch den in einem rubidiumfreien Medium sofort meßbar einsetzenden Rubidiumefflux Radioaktivität aus der Insel in das Waschmedium abgegeben wird und somit der Bestimmung in der Insel entgeht (Täljedahl 1981).

Aus diesen Erkenntnissen wurde die Notwendigkeit zur Verbesserung des Waschverfahrens abgeleitet.

4.2.2 Versuch zur Verbesserung des Waschverfahrens

Malaisse et al. (1978) beschreiben eine Trennung von Inselmaterial und Inkubationsmedium mittels Zentrifugation durch Di-n-butylphthalat. Sehlin und Täljedahl (1974) geben als Dauer für die Waschung 2 Sekunden an. Hierbei wird als Medium nichtradioaktives Basalmedium verwendet. Die Waschung in diesem Medium darf wegen des sofort einsetzenden Rubidiumeffluxes nur von sehr kurzer Dauer sein. Um den Rubidiumefflux in dieser Phase zu unterdrücken, schlägt Täljedahl (1981) vor, die Waschung mit einem 16,7 mM Glucose enthaltenden Medium durchzuführen.

Teil 1: Netzwaschversuche

Es wurden zunächst Leernetzproben über 30 Minuten in Basismedium I inkubiert und unter verschiedenen Bedingungen gewaschen. Danach wurden die Proben wie unter 3.3.5 beschrieben aufgearbeitet.

I) Waschung mit albuminhaltigem Medium

Es wurde Waschmedium I verwendet (mit 2% BSA).

a) einmalige Waschung mit 0,5 ml Medium

Probe	1	2	3	4
cpm	298	1118	2134	3086

Mittelwert: 1659,0 +/- 606,1 (alle Mean +/- SEM)

b) zweimalige Waschung mit je 0,5 ml Medium

Probe	1	2	3	4
cpm	379	627	1109	4921

Mittelwert: 1759,0 +/- 1064,7

c) zweimalige Waschung mit je 0,25 ml Medium

Probe	1	2	3	4
cpm	470	1967	2372	2516

Mittelwert: 1831,4 +/- 468,1

II) Waschung mit albuminfreiem Medium

Es wurde Waschmedium II verwendet (ohne BSA).

a) einmalige Waschung mit 0,5 ml Medium

Probe	1	2	3	4
cpm	852	966	6138	8169

Mittelwert: 4031,3 +/- 1849,1

b) zweimalige Waschung mit je 0,5 ml Medium

Probe	1	2	3	4
cpm	130	306	1462	625

Mittelwert: 630,8 +/- 295,1

c) zweimalige Waschung mit je 0,25 ml Medium

Probe	1	2	3	4
cpm	329	659	684	987

Mittelwert: 664,7 +/- 134,2

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse wurde die unter II b) beschriebene Waschmethode ausgewählt, da diese die geringsten Restcountzahlen ergab und auch die Schwankungen einigermaßen günstig waren. Durch Verbesserung der Handhabung konnte dieses Ergebnis noch vermindert werden.

Teil 2: Einfluß des Hauptinkubationsmediums auf den Wascherfolg bei Leernetzen

In dieser Versuchsreihe wurde ein eventueller Einfluß des Hauptinkubationsmediums auf den Wascherfolg bei Leernetzen untersucht. Dabei wurden Leernetze 30 Minuten lang

I) in albuminhaltigem Medium (Basismedium I)

II) in albuminfreiem Medium (Basismedium II)

inkubiert und mit Waschmedium II (albuminfrei) mehrfach gewaschen.

I) Inkubation mit Albumin

a) zweimalige Waschung mit je 0,5 ml Waschmedium II

Probe	1	2	3	4
cpm	80	249	67	273

Mittelwert: 167,3 +/- 42,2

b) dreimalige Waschung mit je 0,5 ml Waschmedium II

Probe	1	2	3
cpm	107	515	279

Mittelwert: 300,3 +/- 118

c) dreimalige Waschung mit je 0,3 ml Waschmedium II

Probe	1	2	3	4
cpm	494	4407	579	1319

Mittelwert: 1699,8 +/- 921,2

II) Inkubation ohne Albumin

zweimalige Waschung mit je 0,5 ml Waschmedium II

Probe	1	2	3	4
cpm	236	49	84	80

Mittelwert: 112,3 +/- 41,9

Teil 3: Einfluß des Hauptinkubationsmediums auf den Wascherfolg bei Inselmaterial

Es wurde nun untersucht, ob Radioaktivität tatsächlich an Inselgewebe adsorbiert wird und ob von dort überhaupt abgewaschen werden kann. Hierzu wurde das rubidiumhaltige Hauptinkubationsmedium auf die Proben pipettiert und diese sofort aus dem Medium entfernt, gewaschen und weiter aufbereitet (sog. 0-Minuten-Werte). Gewaschen wurden diese Proben zweimal mit je 0,5 ml Waschmedium II (ohne BSA).

I) Inkubation mit Basismedium I (mit 2 % BSA)

Probe	1	2	3	4
cpm	62	98	231	540

Mittelwert: 232,8 +/- 108,7

II) Inkubation mit Basismedium II (ohne BSA)

Probe	1	2	3	4
cpm	67	101	134	134

Mittelwert: 109,0 +/- 16,5

Es zeigt sich deutlich, daß bei Anwesenheit von Albumin im Medium die Adsorption von Radioaktivität an das Gewebe größer ist und hierdurch erheblich höhere Backgroundwerte mit einer entsprechend größeren Streuung erzeugt werden.

Teil 4: Effluxverminderung beim Waschvorgang

Es wurde versucht, durch Zusatz einer höheren Glucosekonzentration (16,7 mM) zum Waschmedium den bei der Waschung bereits stattfindenden Rubidiumefflux zu hemmen und so den Verlust an Radioaktivität aus der Insel zu verringern. Hierzu wurden Proben 60 Minuten lang in Basismedium II (ohne BSA, 0,19 mM ^{86}Rb) inkubiert, dann gewaschen und weiter verarbeitet.

I) zweimalige Waschung mit je 0,5 ml Waschmedium II (3 mM Glucose)

Probe	1	2	3
cpm	470	1333	1918

Mittelwert: 1240,3 +/- 420,6

II) zweimalige Waschung mit je 0,5 ml Waschmedium III (16,7 mM Glucose)

Probe	1	2	3
cpm	1191	1274	1515

Mittelwert: 1326,7 +/- 97,1

Es wird deutlich, daß die Erhöhung der Glucosekonzentration im Waschmedium von 3 mM auf 16,7 mM eine deutlich verbesserte Einheitlichkeit der gemessenen Werte sowie eine geringfügige Erhöhung derselben bewirkt.

Teil 5: Bestimmung der anhaftenden Glucosemenge

Um für die geplanten Effluxversuche sicherzustellen, daß durch die Anwendung von 16,7 mM glucosehaltigem Waschmedium nicht zuviel Glucose in das Effluxmedium verschleppt wird, wurde die an den Inseln anhaftende und die von den Inseln aufgenommene Glucosemenge mittels radioaktiv markierter 6-(^{14}C) Glucose bestimmt. Hierbei wurden Waschmedien ohne Albumin und mit 3 mM sowie 16,7 mM Glucose verwendet. Die Proben wurden nur vorinkubiert, anschließend zweimal mit je 0,5 ml Medium gewaschen und danach der Gehalt bestimmt. Zur Auswertung wurde unter der Annahme, daß die gesamte Menge an ^{14}C-Glucose der Probe an das Effluxmedium abgegeben wird, die Konzentration in den geplanten 0,7 ml Effluxmedium berechnet.

Glucosekonzentration im Waschmedium	an der Insel	in 0,7 ml
3 mM	0,45 µmol	0,31 mM
16,7 mM	2,44 µmol	1,71 mM

Tab.4-4: Menge der durch das Waschen an der Insel adsorbierten Glucose

Dieses Ergebnis zeigt, daß bei der Waschung mit 16,7 mM glucosehaltigem Medium nur vernachlässigbar kleine Glucosemengen in das Effluxmedium verschleppt wurden.

Als Konsequenz aus diesen Versuchen wurde ab Versuch 4.2.3 grundsätzlich mit Waschmedium III gewaschen, das kein Albumin, jedoch 16,7 mM Glucose enthält.

4.2.3 Aufnahmeversuch II

Sehlin (1974) verwendet zur Hauptinkubation ein Medium, das kein Albumin enthält. Aufgrund dieser Tatsache und als Folge des Versuches 4.2.2 wurde in diesem Versuch die Hauptinkubation mit einem albuminfreien Medium (Basismedium II) durchgeführt. Die Konzentration an radioaktivem Rubidium schwankte zwischen 0,08 mM und 0,8 mM. Ein Einfluß dieser Schwankungen auf den Kurvenverlauf konnte nicht festgestellt werden.

Die Dauer der Inkubation betrug 0 bis 120 Minuten.

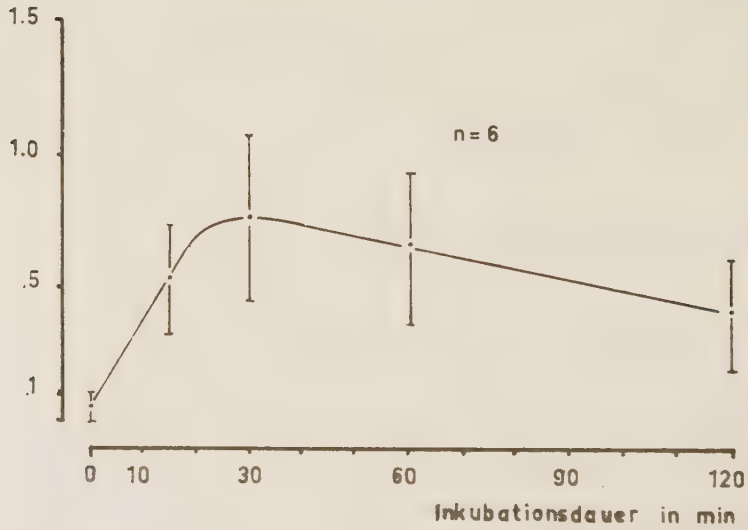
Zeitlicher Verlauf der

Rubidiumaufnahme bei

Ratteninseln in Vitro

I. Inkubation ohne Albumin

Rubidiumgehalt in pmol/Insel



Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml KRB-Puffer
0,2 mM ^{86}Rb

n: Anzahl der Versuche

Mean +/- SEM

Abb.: 4-1

Zeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
0	0,05 +/- 0,02
15	0,52 +/- 0,18
30	0,74 +/- 0,28
60	0,64 +/- 0,26
120	0,45 +/- 0,19

n=6 (Mean +/- SEM)

Tab.4-5: Rubidiumaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit bei Inkubation ohne Albumin siehe Abbildung 4-1

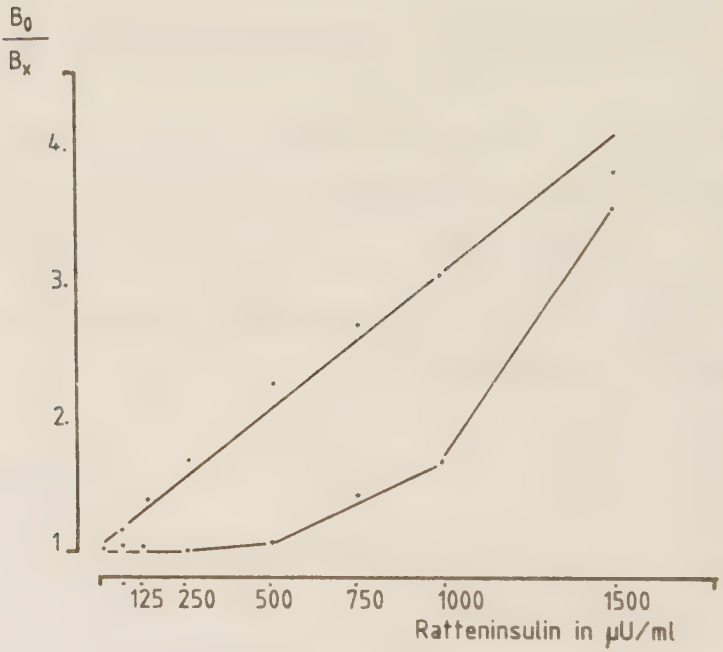
Die Kurve zeigt einen deutlichen Abfall des Inselgehaltes bei mehr als 30 Minuten Inkubationsdauer. Dieser unerwartete Effekt stand im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Sehlin und Täljedahl, 1974) und konnte nicht erklärt werden. Es mußte deshalb die Frage geklärt werden, ob die Inseln unter diesen Versuchsbedingungen überhaupt funktionsfähig waren.

4.2.4 Bestimmung der Insulinsekretion in albuminfreiem Medium

Als Beurteilungsparameter für die Funktionstüchtigkeit von Langerhansschen Inseln dient unter anderem die Insulinsekretion. Es wurde deshalb für das im Versuch 4.2.3 verwendete System untersucht, inwieweit die Insulinsekretion nach Glucosereiz erwartungsgemäß funktioniert.

Die Proben (hier nur je 5 Inseln pro Probe) wurden über 3 Stunden in verschiedenen Medien mit substimulatorischer Glucosemenge (3 mM) und danach für 90 Minuten in gleichartigen Medien, jedoch mit stimulatorischer Glucosemenge (16,7 mM) inkubiert. Es wurde die Insulinsekretion während der 90 Minuten dauernden zweiten Inkuba-

Einfluß von Albumin auf die
Eichkurve des RIA (INSIK^{R})



B_0 = Radioaktivität des gebundenen markierten Insulins bei Abwesenheit von unmarkiertem Insulin

B_x = Radioaktivität des gebundenen markierten Insulins bei Anwesenheit von unmarkiertem Insulin

Abb.: 4-2

tionsphase bestimmt.

Bei der Auswertung des zu diesem Zwecke durchgeführten Radioimmunoassays (s. 3.4) zeigte sich, daß die Eichkurve, bei der die Verdünnungsreihe mit albuminfreiem Medium hergestellt worden war, nicht die vorgeschriebene Linearität zeigte (s. Abb. 4-2). Dies ist vermutlich, da besonders bei den starken Verdünnungen das Ergebnis unzureichend war, entweder auf adsorptive Bindung des Insulins an die Gefäßwände oder auf eine wertkonstante Proteinzerstörung bei der Inkubation der Eichkurvenwerte zurückzuführen. Die in albuminfreiem Medium inkubierten Proben wurden deshalb mit beiden Eichkurven ausgewertet.

Medium	n	IRI (µU/ml/5 Inseln) albuminhaltige	albuminfreie	Eichkurve
2 % BSA	10	791,5 +/- 260,1		-
0,5 % BSA	4	977,0 +/- 188,8		-
0 BSA	6	32,3 +/- 6,6	707,5 +/- 99,6	

(Mean +/- SEM)

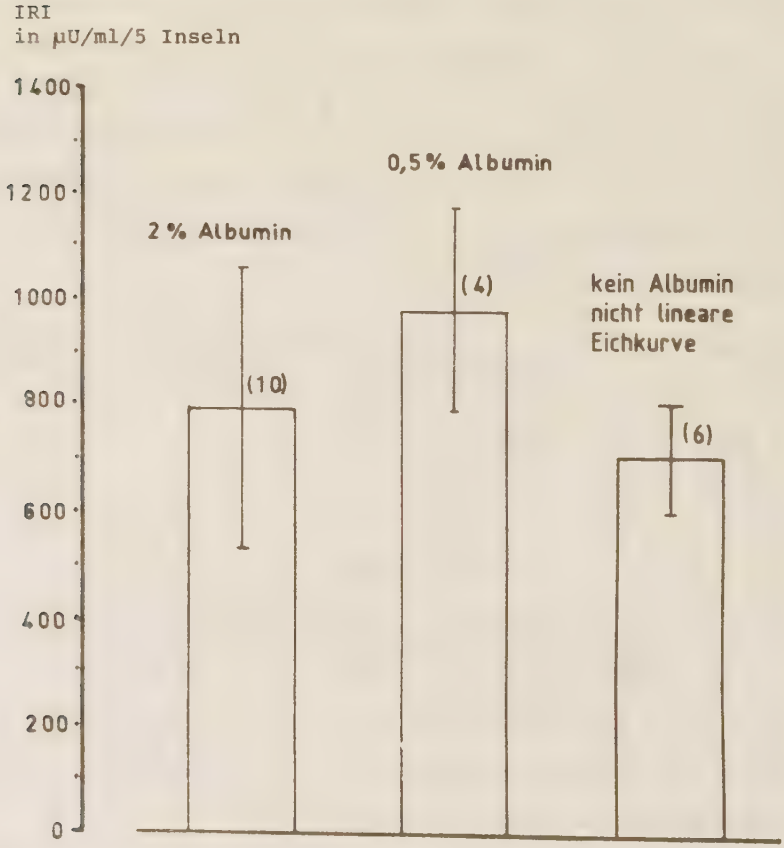
Tab.4-6: Insulinsekretion von Inseln nach Glucosereiz in Medien mit verschiedenen Albuminkonzentrationen siehe Abb. 4-3

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß die Insulinsekretion bei niedrigerer Albuminkonzentration (0,5 %) gegenüber der Sekretionsleistung in Medien mit höherer Albuminkonzentration leicht gesteigert ist. Deutlich wird auch, daß eine Bestimmung des Insulins in albuminfreiem Medium praktisch unmöglich ist, da das Insulin offensichtlich bei der Inkubation bereits der Bestimmung entzogen wird.

In Vitro Effekt von Albumin auf die

Insulinsekretion der Ratteninsel

nach Glucosereiz (16,7 mM)



Anzahl der Versuche in Klammern

Mean +/- SEM

Abb.: 4-3

4.2.5 Aufnahmeversuch III

Um sicherzustellen, daß das Albumin bei den Versuchen zur Messung der Rubidiumaufnahme nicht lediglich zur Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes benötigt wird, wurde es im folgenden Versuch durch eine entsprechende Menge Dextran ersetzt. Leclerque-Meyer et al. (1976) beschreiben einen solchen Austausch von Albumin gegen Dextran bei der Perfusion. Sie verwenden dabei jedoch als Ersatz für den 2 %-igen Albuminzusatz in den normalen Medien 4 % Dextran und 0,5 % Albumin. Da bei diesem Versuch jedoch ganz auf das Albumin verzichtet werden sollte, wurde die Dextrankonzentration zur Erhaltung physiologischer Bedingungen auf 6 % erhöht und kein Albumin zugesetzt. Mit dem so veränderten Basismedium I wurde eine Aufnahmekurve erstellt.
Die Inkubationsdauer wurde von 0 bis 120 Minuten gesteigert, die Rubidiumkonzentration war 0,7 mM.

Zeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
0	0,146 +/- 0,06
15	2,452 +/- 0,45
30	3,248 +/- 0,66
60	2,588 +/- 0,41
120	1,241 +/- 0,22

n=3 (Mean +/- SEM)

Tab. 4-7: Rubidiumaufnahme der Insel in Abhängigkeit von der Zeit bei Inkubation in dextranhaltigem Medium
siehe Abb. 4-4

Auch diese Kurve zeigt, entsprechend der ohne Albumin aufgenommenen, einen deutlichen Abfall des Rubidiumgehaltes der Langerhans-

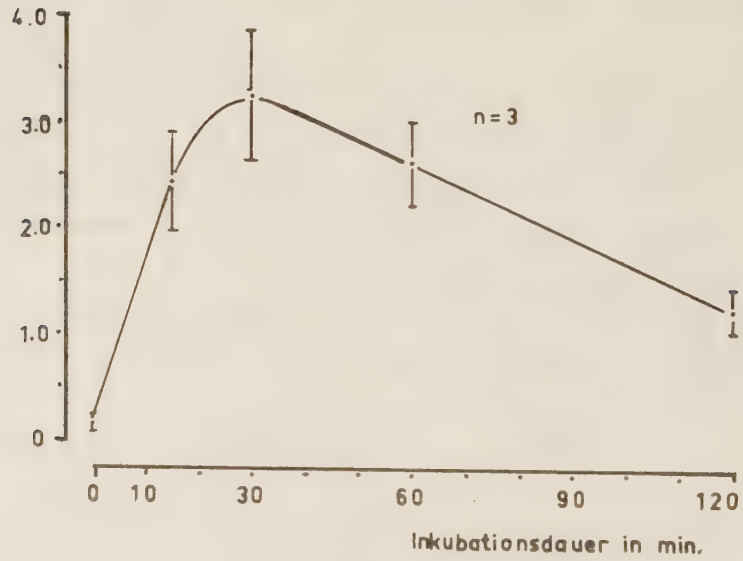
Zeitlicher Verlauf der

Rubidiumaufnahme bei

Ratteninseln in Vitro

II. Inkubation mit Dextran

Rubidiumgehalt in pmol/Insel



Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml KRB-Puffer
0,2 mM ^{86}Rb

n: Anzahl der Versuche

Mean +/- SEM

Abb.: 4-4

schen Inseln bei einer Inkubationsdauer länger als 30 Minuten. Das erwartete Gleichgewicht stellte sich nicht ein.

4.2.6 Untersuchung der Überlebensfähigkeit der Inseln in albuminfreiem oder dextranhaltigem Medium

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob Albumin nur für die Insulinsekretion oder überhaupt für die Überlebensfähigkeit der Inseln notwendig ist.
Hierzu wurden Gruppen von jeweils 5 Inseln zunächst für 3 Stunden in Medien ohne Albumin mit substimulatorischer Glucosekonzentration inkubiert (Phase I) und anschließend in albuminhaltigen Medien mit 16,7 mM Glucose 90 Minuten lang inkubiert (Phase II). Es wurde dann die in Phase II sezernierte Insulinmenge bestimmt.

Phase I	Phase II	IRI (µU/ml/5 Inseln)	n
0 Albumin	2 % Albumin	1086,1 +/- 73,2	5
6 % Dextran	2 % Albumin	890,2 +/- 86,3	5
2 % Albumin	2 % Albumin	791,1 +/- 84,3	5
0,5 % Albumin	0,5 % Albumin	977,0 +/- 94,4	5
		(Mean +/- SEM)	

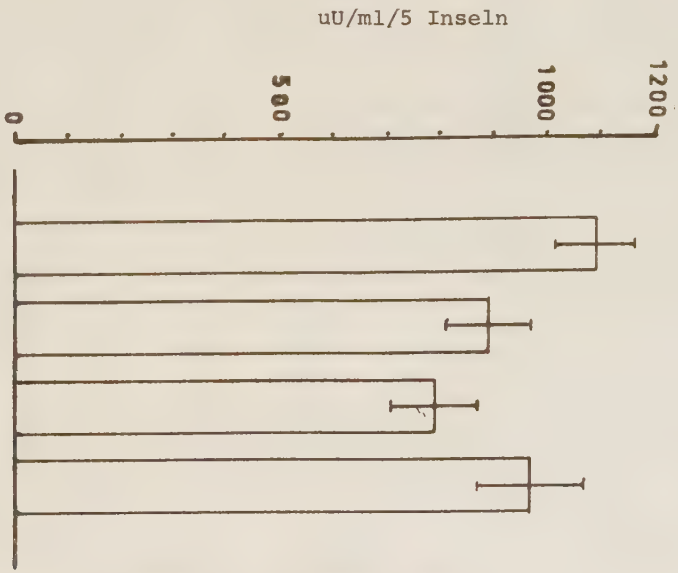
Tab.4-8: Einfluß von Dextran und Albumin auf die Überlebensfähigkeit der Langerhansschen Inseln
siehe Abb. 4-5

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß auch bei den Gruppen, die in Phase I in nicht albuminhaltigem Medium inkubiert wurden, nach Umsetzen in ein albuminhaltiges Medium und Stimulation mit 16,7 mM Glucose die Insulinsekretion einwandfrei stattfand. Hier-

Einfluß von Albumin und Dextran auf die Überlebensfähigkeit der Ratteninsel in Vitro

Parameter: Insulinsekretion

Phase I	Phase II
180 min	90 min
3 mM Glucose	16,7 mM Glucose
kein	2 %
Albumin	Albumin
6 %	2 %
Dextran	Albumin
2 %	2 %
Albumin	Albumin
0,5 %	0,5 %
Albumin	Albumin



Insulinsekretion während Phase II

Inkubation: 5 Inseln in 1 ml KRB

n = 5

Mean +/- SEM

Abb. 4-5

aus kann geschlossen werden, daß die Inseln in albuminfreiem Medium durchaus überleben, zumindest, wenn als Beurteilungskriterium die Insulinsekretion dient.

4.2.7 pH- und Wartebankkontrolle

Da Sehlin und Täljedahl (1974, 1975) in ihren Arbeiten die Aufnahme von Rubidium ohne Albumin im Medium bestimmten und aus den obigen Versuchen eine Notwendigkeit für einen Albuminzusatz nicht abzuleiten ist, wurden weitere Versuche zur Untersuchung der Ursache für das Absinken des Rubidiumgehaltes nach 30 min Inkubationsdauer in albuminfreiem Medium durchgeführt.
Hierzu wurde zunächst versucht, den Inselgehalt nach 30 Minuten Inkubationsdauer sicher zu bestimmen. Da die gleichzeitige Behandlung von mehr als 3 Inselgruppen technisch unmöglich war, wurden die Proben in 3-er Gruppen im Abstand von 20 Minuten in das Inkubationsmedium gesetzt.

Teil 1:
Die nicht sofort eingesetzten Inselgruppen wurden während ihrer Wartezeit in eiskalter Hanks-Lösung aufbewahrt.
Für die einzelnen Gruppen wurden folgende Inselgehalte ermittelt (Rb-Konz. 0,8 mM, Basismedium II, Inkubationsdauer 30 Minuten):

Gruppe	Wartezeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
1	0	5,382 +/- 0,512
2	20	4,132 +/- 0,939
3	40	4,157 +/- 1,500
4	60	2,129 +/- 0,337
5	80	0,440 +/- 0,260

n=3 (Mean +/- SEM)

Tab.4-9: Einfluß der Wartezeit vor der Inkubation auf die Rubidiumaufnahme der Langerhansschen Inseln

Dieses Ergebnis zeigt einen überraschenden Zusammenhang zwischen der Dauer der Wartezeit und der Rubidiumaufnahmefähigkeit: die Inselgruppen verlieren in diesem System zeitabhängig ihre Fähigkeit zur Aufnahme von Rubidium. Die Ursache hierfür könnte eine Schädigung der Zellfunktionen durch die Aufbewahrung in der eiskalten Hanks-Lösung sein. Offensichtlich wird die Funktionsfähigkeit der Inseln durch den Versuch, die Stoffwechselvorgänge nach der Vorinkubation schlagartig und über längere Zeit zu unterdrücken, beeinträchtigt. Aus diesem Grunde wurde das Aufbewahrungsmedium gewechselt.

Teil 2:

Aufgrund der obigen Erfahrungen wurde nun als Aufbewahrungsmedium (Wartebank) das Basismedium II verwendet (KRB mit 3 mM Glucose). Die Wartebank wurde bei 37 ^{o}C unter Schütteln im Wasserbad aufbewahrt und mit Carbogen begast.

Bei der Wiederholung des Aufnahmeversuches ergab sich folgendes Bild (Inkubationsdauer 30 min):

Gruppe	Wartezeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
1	0	0,634 +/- 0,165
2	20	0,531 +/- 0,164
3	40	0,150 +/- 0,122
4	60	0,199 +/- 0,062
5	80	0,116 +/- 0,046

n=3 (Mean +/- SEM)

Tab.4-10: Einfluß der Wartezeit auf die Rubidiumaufnahme bei Aufbewahrung der Inseln in 37 °C warmem Medium unter Begasung

Auch bei diesem Versuchssystem wurde das Rubidiumaufnahmevermögen mit steigender Wartezeit der Inseln vor der Hauptinkubation immer geringer.

Teil 3:

Da bei der Überprüfung des pH-Wertes der Aufbewahrungslösung ein starker Anstieg (bis pH 8,6) zu beobachten war, wurde zur besseren pH-Einstellbarkeit versuchsweise auf die Begasung verzichtet. Eine erneute Bestimmung des Rubidiumgehaltes brachte folgendes Ergebnis (Inkubationsdauer 30 min, Medien wie in Teil 2):

Gruppe	Wartezeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
1	0	0,966 +/- 0,105
2	20	1,471 +/- 0,220
3	40	0,677 +/- 0,109
4	60	1,080 +/- 0,408
5	80	1,263 +/- 0,173

n=3 (Mean +/- SEM)

Tab.4-11: Einfluß verschiedener Wartezeiten vor der Inkubation auf die Rubidiumaufnahme der Insel bei Aufbewahrung ohne Begasung

Unter diesen Versuchsbedingungen war die von der Aufbewahrungs-

dauer abhängige Abnahme der Rubidiumaufnahme erheblich geringer als in den vorangegangenen Versuchen. Da jedoch der pH-Wert des Aufbewahrungsmediums weiterhin eine zu schlechte Konstanz zeigte, wurde nach einem besser gepufferten System gesucht.

Teil 4:

Lernmark et al. (1975) und Idahl et al. (1978) beschrieben die Verwendung von mit HEPES gepufferten Medien zur Inkubation. Deshalb wurde in diesem Versuch als Hauptinkubations- und Aufbewahrungsmedium die unter 2.4.3 beschriebene KR-HEPES-Lösung verwendet. Diese Lösung enthielt 3 mM Glucose, kein Albumin und wurde nicht begast. Es wurde erneut ein Aufnahmeversuch durchgeführt (Inkubationsdauer 30 min):

Gruppe	Wartezeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
1	0	0,584 +/- 0,191
2	40	0,697 +/- 0,187
3	80	0,364 +/- 0,002
4	100	0,077 +/- 0,010
	n=3	(Mean +/- SEM)

Tab.4-12: Rubidiumaufnahme der Insel bei unterschiedlichen Wartezeiten und Verwendung von HEPES-gepuffertem Medium

Bei diesem Versuch zeigte sich erneut eine starke Abnahme der Rubidiumaufnahme in Abhängigkeit von der Wartezeit. Der pH-Wert des Aufbewahrungsmediums hatte sich während des Versuches kaum verändert, so daß als Ursache eigentlich nur noch das Fehlen von Albumin im Medium in Frage kam.

Teil 5:

In diesem Versuch wurde das in Teil 4 verwendete Medium nun mit

0,5 % BSA versetzt und sowohl für die Wartebank als auch für die Hauptinkubation verwendet (Basismedium IV). Es wurde erneut ein Aufnahmeversuch durchgeführt (Inkubationszeit 30 Minuten):

Gruppe	Wartezeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
1	0	0,853 +/- 0,400
2	40	0,564 +/- 0,261
3	75	0,412 +/- 0,812
4	100	0,418 +/- 0,200
	n=3	(Mean +/- SEM)

Tab.4-13: Rubidiumaufnahme der Insel bei verschiedenen Wartezeiten und Verwendung von HEPES und albuminhaltigen Medien

Zwar sank auch in diesem Versuch die Aufnahmefähigkeit der Insel nach 40 Minuten Wartezeit ab, sie stabilisierte sich jedoch danach und zeigte bis 100 Minuten Wartezeit keine Veränderung mehr.

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihen wurde abgeleitet, daß die Anwesenheit von Albumin in den Medien und eine ausreichende Pufferung zur Erhaltung der pH-Konstanz für die Durchführung von Inkubationsversuchen unter den hier beschriebenen Bedingungen absolut notwendig sind.

4.2.8 Aufnahmeversuch IV

Mit dem in Versuch 4.2.7 optimierten Inkubationsmedium (Basismedium IV) wurde nun versucht, eine Aufnahmekurve zu erstellen.

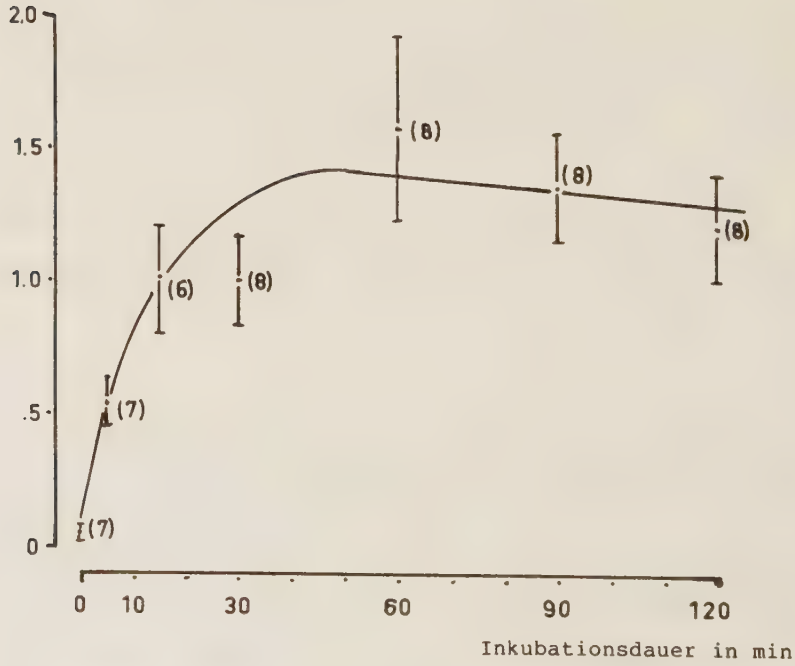
Zeitlicher Verlauf der

Rubidiumaufnahme bei

Ratteninseln in Vitro

III. Inkubation mit 0,5 % Albumin

Rubidiumgehalt in pmol/Insel



Inkubation: 20 Inseln in 0,7 ml KRB-Puffer
0,2 mM ^{86}Rb

Anzahl der Versuche in Klammern

Mean +/- SEM

Abb.: 4-6

Die Konzentration an radioaktivem Rubidium war dabei 0,196 mM. Zur Waschung wurde das albuminfreie Waschmedium III verwendet. Die Zuordnung der Inselgruppen wurde gemäß den Regeln der Statistik randomisiert.

Zeit in min	Rubidiumgehalt in pmol / Insel	n
0	0,068 +/- 0,009	7
5	0,547 +/- 0,077	7
15	1,010 +/- 0,214	6
30	1,014 +/- 0,119	8
60	1,585 +/- 0,285	8
90	1.321 +/- 0,217	8
120	1,209 +/- 0,207	8
180	1,903 +/- 0,985	3
Leernetze (60 min)	0,047 +/- 0,012	7
	(Mean +/- SEM)	

Tab.4-14: Rubidiumaufnahme der Langerhansschen Insel in Abhängigkeit von der Zeit bei Verwendung von mit HEPES gepuffertem albuminhaltigem Medium siehe Abbildung 4-6

Bei der hier gezeigten Aufnahmekurve läßt sich kein signifikanter Abfall des Inselgehaltes bei Inkubationszeiten länger als 30 Minuten mehr beobachten. Der dennoch nach 60 Minuten auftretende leichte Abfall liegt innerhalb der Meßtoleranzen. Ab einer Inkubationszeit von 90 Minuten ist der Gleichgewichtszustand erreicht. Der etwas höhere 180-Minuten-Wert wird durch die größere Streuung relativiert. Der sich aus den über 60 Minuten mitinkubierten Leernetzen ergebende Background ist vernachlässigbar gering und blieb deshalb bei der Auswertung unberücksichtigt.
Die Versuche zur Erstellung einer Aufnahmekurve konnten somit abgeschlossen werden.

4.3 Bestimmung der Rubidiumeffluxrate

Sehlin und Täljedahl (1974) konnten zeigen, daß der Rubidiumefflux durch Stimulation der Insel mit Glucose (20 mM) gehemmt wird. Um bei diesen Versuchen Vergleiche zwischen einzelnen Inselgruppen mit teilweise unterschiedlichen Inselgehalten zu Beginn der Effluxmessung machen zu können, wurde in den Versuchen die Effluxrate pro Zeiteinheit in Bezug auf den Ausgangsgehalt bestimmt.

4.3.1 Effluxmessung nach der Außenmediummethode

Inselgruppen wurden in radioaktives Rubidium enthaltendem Medium bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes inkubiert. Nach Waschung und Umsetzung in das Effluxmedium wurde im Außenmedium und in der Insel der Rubidiumgehalt bestimmt. Aus diesen Werten konnte der Anfangsgehalt errechnet werden. Die Effluxrate ergibt sich dann aus dem Außenmediumgehalt dividiert durch den Ausgangsgehalt der Probe pro Insel und Zeiteinheit.

4.3.1.1 Vorversuch I

Zunächst wurden in einem Vorversuch Proben mit jeweils 20 Inseln 30 Minuten lang in Basismedium II inkubiert. Dieses albuminfreie Medium konnte verwendet werden, weil bei so kurzer Inkubationszeit die Aufnahmewerte einigermaßen konstant sind. Notwendig war

die Verwendung eines albuminfreien Mediums, da erwartet wurde, daß in einem Medium ohne Albumin die Adsorption und somit das Verschleppen von Radioaktivität aus dem Hauptinkubationsmedium in das Effluxmedium minimal bleiben würde.

Nach der Inkubation wurden die Netzgefäße aus dem Aufnahmemedium herausgenommen und das im Netzgefäß verbliebene Restvolumen auf einem Kleenextuch abgesaugt. Auf eine Waschung wurde verzichtet, um den Efflux nicht vorzeitig in Gang zu setzen. Danach wurden die Inselgruppen in Rundbodengefäße gestellt und das Effluxmedium von oben in das Netzgefäß einpipettiert. Das Effluxmedium bestand aus Basismedium II und enthielt bei Versuch 1) 16,7 mM Glucose, bei Versuch 2) 3 mM Glucose. Nach 10 Minuten Effluxinkubation im Wasserbad bei 37 °C unter Schütteln wurden die Inseln aus dem Medium entfernt und der Rubidiumgehalt im Außenmedium bestimmt. Bei den Inseln wurde der Gehalt wie unter 3.3.4 beschrieben bestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Counts pro 20 Inseln cpm	Effluxcounts in 0,7 ml Medium / 10 Minuten cpm
1) 341	24913
488	61523
2) 175	54691
59	49112

Effluxmedium: 1) KRB mit 16,7 mM Glucose
2) KRB mit 3 mM Glucose

Tab.4-15: Effluxaußenmediummethode. Verteilung der Radioaktivität zwischen Inseln und Außenmedium. Vorversuch mit verschiedenen Glucosekonzentrationen

Die in diesem Versuch im Außenmedium gemessenen Countzahlen lagen um ein Vielfaches höher als dies nach der Kenntnis des Inselgehaltes (Versuche 4.2) rechnerisch möglich gewesen wäre. Es wurde dafür als Ursache eine Verschleppung von Radioaktivität aus dem Hauptinkubationsmedium in das Effluxmedium angenommen. Für diese Verschleppung kamen als Verursacher vor allem die Styrolrohre mit ihrer relativ großen Oberfläche in Frage.

4.3.1.2 Bestimmung der Rubidiumadsorption an Styrolrohren

Zunächst war die Frage zu klären, ob an den Styrolrohren so viel Radioaktivität adsorbiert wird, daß diese durch Kontamination des Mediums den Efflux der Inseln überdecken kann. Deshalb wurde die Menge des nach der Inkubation an den Styrolrohren befindlichen Rubidiums bestimmt. Dazu wurden die Styrolrohre nach dem Abziehen der Netze in ein Szintillationsgefäß gegeben und nach Zusatz von 16 ml Unisolve I, Schütteln und 24-stündigem Stehen im ß-Counter gemessen.
Um abzusichern, daß die eventuell an den Styrolrohren anhaftende Radioaktivität auch tatsächlich an das Effluxmedium abgegeben wird, wurden im gleichen Versuch Styrolrohre ohne Inselmaterial inkubiert und in ein Effluxmedium gestellt. Die im Effluxmedium enthaltene Radioaktivität wurde wie oben bestimmt.

Styrolrohrcountzahl:	51373 +/- 13862
Effluxmediumcountzahl des "Styrolrohreffluxes":	35347 +/- 5388
Aufnahmecountzahl nach 30 min (zum Vergleich bei 20 Inseln):	1323 +/- 77
Standardcountzahl (10 µl Inkubationsmedium):	191672 +/- 669

n=3 (Mean +/- SEM)

Tab.4-16: Bestimmung der an den Netzgefäßen adsorbierten und in das Effluxmedium abgegebenen Radioaktivität

Dieses Ergebnis zeigt, daß durch die Styrolrohre erheblich mehr Radioaktivität in das Effluxmedium eingebracht wurde, als die Inseln überhaupt aufnehmen konnten. Die Methode mußte deshalb so abgewandelt werden, daß eine Kontamination des zu bestimmenden Mediums durch die Styrolrohre ausgeschlossen war.

4.3.1.3 Versuch zur Verbesserung der Inselauflösung

Da nicht auszuschließen war, daß der verwendete Gewebelöser (Hyamin) die Inseln nicht schnell und vollständig genug auflöst, wurde seine Wirkung im Vergleich zu zwei anderen, handelsüblichen Gewebelösern ausgetestet. Hierzu wurden Inseln wie in den vorangegangenen Aufnahmeversuchen über 90 Minuten in radioaktivem Medium inkubiert. Danach wurden sie gewaschen und in einem Szintillationsgefäß mit jeweils 10 µl der verschiedenen Gewebelöser versetzt. Nach 10 Minuten wurde mit 16 ml Unisolve I aufgefüllt und nach 1 Stunde gemessen.

Gewebelöser	Rubidiumgehalt in pmol / Insel
Hyamin	2,134 +/- 0,691
TS 1 (Zinsser)	3,878 +/- 2,215
Gewebelöser R. de Haen	5,577 +/- 1,350
n=3	(Mean +/- SEM)

Tab.4-17: Vergleich der Auflöseeigenschaften verschiedener Gewebelöser

Auf Grund des hier gefundenen Ergebnisses wurde bei den folgenden Versuchen zur Auflösung von Inseln der Gewebelöser Riedel de Haen verwendet.

4.3.1.4 Vorversuch II

Um eine Verfälschung der Messungen durch die an den Styrolrohren adsorbierte Radioaktivität zu verhindern, wurden nun zwei Wege weiterverfolgt:

a) Bestimmung des Effluxes im Außenmedium (Außenmediummethode)

b) Bestimmung des Effluxes durch Messung des Restinselgehaltes und Berechnung des Verlustes (Inselrestmethode)

zu a): Außenmediummethode

Da, wie aus Versuch 4.3.1.2 ersichtlich, ein Einstellen der Inseln mitsamt Netz und Styrolrohr in das Effluxmedium nicht möglich war, wurden nun die Inseln nach der Inkubation zweimal gewaschen und die Netze anschließend abgezogen. Die Netze mit den Inseln wurden in ein Rundbodengefäß mit 0,7 ml Effluxmedium transferiert. Nach Ablauf der Effluxphase (10 Minuten) wurden

0,65 ml des Effluxmediums entnommen, in ein Szintillationsgefäß überführt und gemessen. Die Volumendifferenz wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

zu b): Inselrestmethode

Bei dieser Methode wurde der Efflux durch Bestimmung der Veränderung des Inselgehaltes untersucht. Hierzu wurden jeweils zwei Inselgruppen 30 Minuten lang mit ^{86}Rubidium beladen. Eine Gruppe wurde nach der Inkubation direkt in das Effluxmedium gestellt, die andere Gruppe vorher noch durch zweimaliges Einpipettieren von 0,5 ml Waschmedium III gewaschen. Die Netze mußten hierzu nicht von den Styrolrohren entfernt werden, da eine Messung des Effluxmediums ja nicht durchgeführt wurde. Nach Ablauf der Effluxphase wurden die Inselgruppen aus dem Medium genommen, die Netze abgezogen und wie unter 3.3.5 beschrieben weiterbehandelt.

Bei beiden Methoden wurde zusätzlich noch eine Inselgruppe über 30 Minuten beladen, bei der dann sofort der Inselgehalt bestimmt wurde. Sie lieferte den Ausgangswert für die Berechnung der Differenz bei der Inselrestmethode sowie des prozentualen Verlustes bei beiden Methoden.

Um die prinzipielle Funktionsfähigkeit der beiden Methoden zu untersuchen, wurde zunächst die Außenmediummethode mit der Inselrestmethode durch Berechnung des prozentualen Verlustes in einem 3 mM Glucose enthaltenden Medium verglichen.

Methode	Verlust an Rubidium in % / 10 min Efflux bei 3 mM Glucose im Medium
Außenmedium	57,7 +/- 5,8
Inselrest	68,5 +/- 4,6
n=4	(Mean +/- SEM)

Tab.4-18: Vergleich der Effluxmessmethoden

Dieses Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Methoden, sie scheinen also beide durchführbar zu sein.

Um die Frage der Notwendigkeit einer Waschung zwischen der Beladungsphase und der Effluxphase bei der Inselrestmethode zu entscheiden, wurden die Inselgehalte nach der Effluxphase miteinander verglichen. Es ergaben sich folgende Werte:

	Inselgehalt in pmol / Insel
gewaschen	1,562 +/- 0,321
nicht gewaschen	1,75 +/- 0,358
n=4	(Mean +/- SEM)

Tab.4-19: Einfluß der Waschung auf den Endgehalt der Insel bei der Inselrestmethode

Dieses Ergebnis zeigt, daß durch die Waschung offensichtlich eine gewisse Menge an Rubidium von der Insel verloren wird. Dies ist wahrscheinlich auf an der Insel und dem Netz anhaftendes Rubidium zurückzuführen. Da bei den gewaschenen Inseln die Streuung etwas geringer war, wurde bei den folgenden Versuchen bei der Inselrestmethode eine Waschung durchgeführt.

4.3.1.5 Einfluß der Glucosekonzentration auf den Efflux

Um eine endgültige Aussage über die Funktionsfähigkeit der beiden Methoden machen zu können, beziehungsweise, um eventuelle Vorteile der einen oder der anderen Methode herauszufinden, wurde in den in 4.3.1.4 beschriebenen Systemen der Rubidiumefflux bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen untersucht.

Aus der Literatur war bekannt (Sehlin und Täljedahl, 1974), daß bei Stimulation der Inseln im statischen System mit 16,7 mM Glucose eine deutliche Hemmung des Rubidiumeffluxes (etwa 20 %) gegenüber 3 mM Glucose stattfindet. Es sollte nun untersucht werden, ob in dem hier beschriebenen Versuchssystem ein ähnlicher Effekt zu finden war. Hierzu wurde der Efflux in einem Medium mit 3 mM Glucose und in einem Medium mit 16,7 mM Glucose (Basismedium III) sowohl nach der Inselrestmethode als auch nach der Außenmediummethode bestimmt.

Methode	Rubidiumefflux in % / 10 min bei einer Glucosekonzentration von 3 mM	16,7 mM
Außenmedium	83,15 +/- 13,78	78,90 +/- 9,12
Inselrest	58,56 +/- 5,88	55,21 +/- 9,84

Effluxhemmung durch 16,7 mM Glucose:

bei der Außenmediummethode um 4,25 % +/- 11,16 %

bei der Inselrestmethode um 3,36 % +/- 9,84 %

n=4 (Mean +/- SEM)

Tab.4-20: Hemmung des Rubidiumeffluxes durch 16,7 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM Glucose in verschiedenen statischen Systemen

Dieses Ergebnis zeigt, daß bei der Außenmediummethode eine etwas stärkere Hemmung des Rubidiumeffluxes durch 16,7 mM Glucose meßbar war. Allerdings ist in diesem Versuchsaufbau nur etwa ein Fünftel der von Sehlin und Täljedahl (1974) beschriebenen Hemmung zu beobachten. Dies ist zum einen auf die große Streuung der Einzelwerte, bedingt durch unterschiedliche Aufnahme der Inselgruppen, zurückzuführen (es war zum Teil bei den Proben mit 16,7 mM Glucose rechnerisch ein gegenüber den Werten mit 3 mM Glucose gesteigerter Rubidiumefflux zu beobachten), zum anderen konnte es aber auch sein, daß der eigentliche, glucosekontrollierte Rubidiumefflux noch gar nicht begonnen, beziehungsweise die glucoseinduzierte Hemmung noch nicht stattgefunden hatte. Als Konsequenz aus diesem Ergebnis wurde ab sofort nur noch die Außenmediummethode durchgeführt.

4.3.1.6 Messung des Rubidiumeffluxes zu einem späteren Zeitpunkt

Unter der Voraussetzung, daß sich der Rubidiumefflux nach der erfolgten Inkubation der Inseln in rubidiumhaltigem Medium zunächst normalisieren muß, wurde zur Equilibrierung der Inseln nach der Beladung eine 5 Minuten dauernde Praeeffluxphase eingeführt. Um den Fehler, der bei der Berechnung des Inselgehaltes über eine getrennte Aufnahmegruppe zwangsläufig entsteht, zu eliminieren, wurde der Gehalt der Inseln nach dem Efflux bestimmt und der Anfangsgehalt zurückgerechnet. Dazu wurden die Inselgruppen nach dem Waschen für 5 Minuten in ein Rundbodengefäß mit 3 mM Glucose enthaltendem Medium eingestellt. Danach wurde das Netz abgezogen und in das Effluxmedium transferiert. Nach Ablauf der Effluxphase wurden 0,65 ml abpipettiert und der Rubidiumgehalt bestimmt. Der Gehalt des Netzes mit den restlichen 0,05 ml Medium wurde getrennt bestimmt. Der Netzwert sowie der Außenmediumwert wurden um die dem Restvolumen entsprechenden counts korrigiert. Der prozentuale Efflux wurde aus dem Restinselgehalt und dem Außenmediumgehalt berechnet. Es wurde erneut die Hemmung des Effluxes durch 16,7 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM Glucose untersucht.

Glucosekonzentration		Efflux in % des Inselgehaltes
3 mM		78,20 +/- 10,01
16,7 mM		57,51 +/- 6,54
Effluxhemmung durch 16,7 mM Glucose:	um	20,73 +/- 6,40 %
	n=4	(Mean +/- SEM)

Tab.4-21: Effluxhemmung durch 16,7 mM Glucose im Vergleich zu 3 mM Glucose bei der Außenmediummethode mit Praeefflux (5 min)

Bei dieser Methode konnte durch Stimulation der Inseln mit Glucose (16,7 mM) eine Hemmung des Effluxes um etwa 20 % gegenüber dem Efflux bei 3 mM Glucose erreicht werden. Da die Streuung der Einzelwerte jedoch sehr groß war und dieser Effekt einen Maximalwert darstellt, wurde zur Untersuchung des Rubidiumeffluxes die Perifusion installiert.

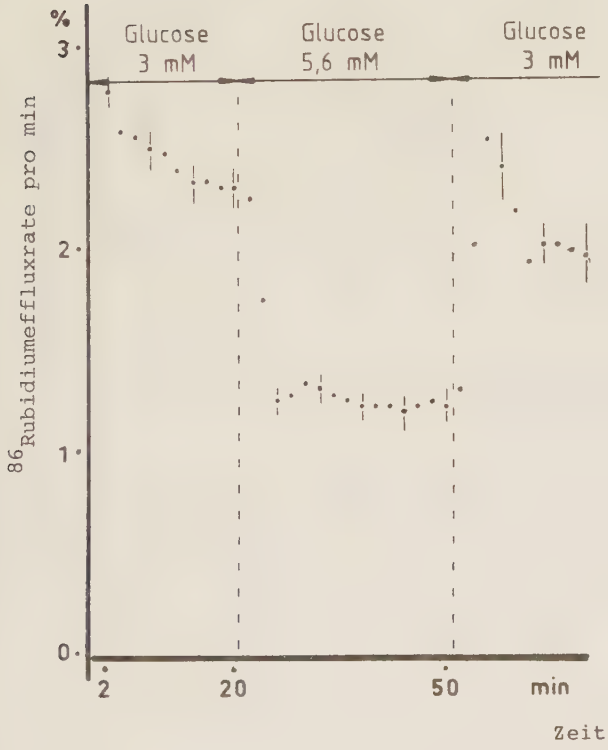
4.4 Perifusion

Um die unter 3.4 beschriebene Apparatur auf ihre Funktionstüchtigkeit zu untersuchen, wurden die im folgenden beschriebenen allgemeinen Vorversuche durchgeführt.

4.4.1 Effluxhemmung durch Glucose

Zunächst wurde die aus der Literatur (Henquin, 1978) bekannte Hemmung des Rubidiumeffluxes durch stimulatorische Glucosekonzentrationen untersucht. Dazu wurden jeweils 20 Inseln zunächst in

Einfluß der Änderung der Glucosekonzentration
auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln
Steigerung von 3 mM auf 5,6 mM



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min
Anzahl der Versuche: 3
Mean +/- SEM

Abb.: 4-7

der Vorphase mit einem 3 mM glucosehaltigen Medium vorperifundiert. Nach 20 Minuten wurde auf ein 5,6 mM glucosehaltiges Medium umgeschaltet. Nach dem Ende der Stimulationsphase (Minute 50) wurde auf das Vorperifusionsmedium zurückgeschaltet. Als Vergleich diente eine Gruppe, die in der Stimulationsphase nur mit 3 mM Glucose im Medium perifundiert wurde.

Parameter:	Glucose 3 mM	Glucose 5,6 mM
Bedingungen		
Vorlauf:	3 mM Glucose	3 mM Glucose
Stimulation:	3 mM Glucose	5,6 mM Glucose
Nachlauf:	3 mM Glucose	3 mM Glucose
Effluxrate Vorlauf:	2,1 +/- 0,08 %	2,3 +/- 0,1 %
Rate Stimulation:	1,8 +/- 0,08 %	1,2 +/- 0,1 %
Quotient:	0,8 +/- 0,03	0,5 +/- 0,01
Anzahl Versuche:	4	3
		(Mean +/- SEM)

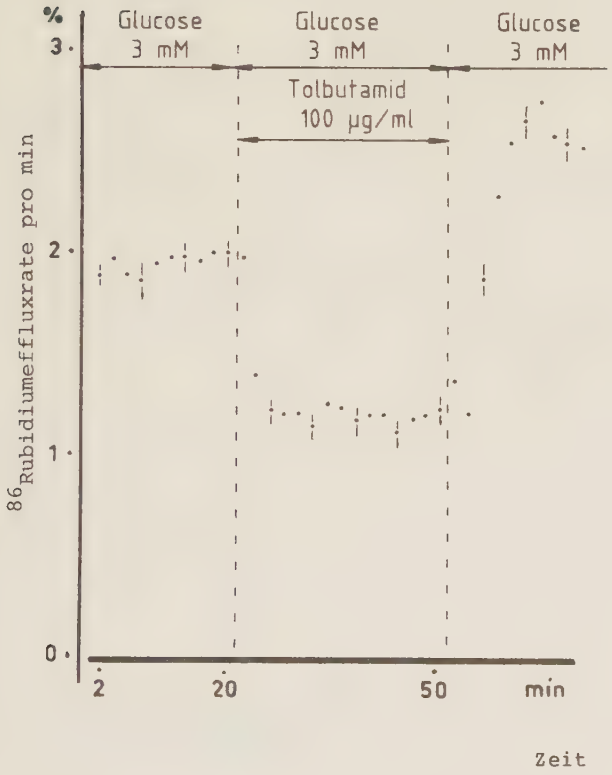
Tab.4-22: Untersuchung der Wirkung von 5,6 mM Glucose auf den Rubidiumefflux in der Perifusion
siehe Abb.: 4-7

Es konnte eine Hemmung des Rubidiumeffluxes durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium auf 5,6 mM gezeigt werden. Der in der Literatur (Henquin, 1978) beschriebene Wert wurde erreicht.

4.4.2 Untersuchung der Wirkung von Tolbutamid

Da die Hemmung des Rubidiumeffluxes durch 16,7 mM Glucose sicher einen Maximaleffekt darstellt, wurde zur weiteren Überprüfung der Apparatur der Effekt von Tolbutamid (100 µg/ml) untersucht. Dazu wurde in der Stimulationsphase ein Medium mit 3 mM Glucose und

Einfluß von Tolbutamid (100 µg/ml) auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 3

Mean +/- SEM

Abb.: 4-8

100 µg/ml Tolbutamid zugeschaltet. Als Vergleich diente eine Gruppe, bei der in der Stimulationsphase auf ein Medium mit 3 mM Glucose, jedoch ohne Tolbutamid, umgeschaltet wurde.

Parameter:	Tolbutamid 100 µg/ml	Glucose 3 mM
Bedingungen		
Vorlauf:	3 mM Glucose	3 mM Glucose
Stimulation:	3 mM Glucose Tolbutamid 100 µg/ml	3 mM Glucose -
Nachlauf:	3 mM Glucose	3 mM Glucose
Rate Vorlauf:	2,35 +/- 0,04 %	2,26 +/- 0,1 %
Rate Stimulation:	1,40 +/- 0,02 %	1,71 +/- 0,07 %
Quotient:	0,60 +/- 0,02	0,77 +/- 0,07
Anzahl Versuche:	3	3 (Mean +/- SEM)

Tab.4-23: Einfluß von Tolbutamid (100 µg/ml) auf den Rubidiumefflux von Inseln
siehe Abb.: 4-8

Es konnte eine Hemmung des Rubidiumeffluxes durch Tolbutamid gezeigt werden. Der Effekt entspricht den Angaben der Literatur (Henquin et al., 1979 b).

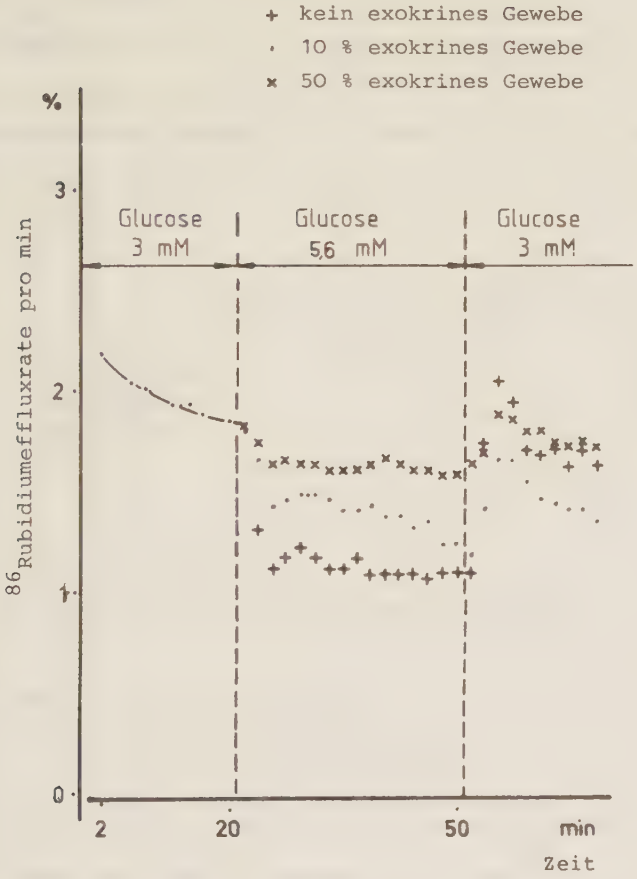
Mit diesen Vorversuchen ist die Funktionsfähigkeit des Perifusionssystemes bewiesen.

4.4.3 Untersuchung der Störwirkung von exokrinem Pankreasgewebe bei Rubidiumeffluxmessungen

Um einen eventuell störenden Einfluß von exokrinem Pankreasgewebe auf den Rubidiumefflux zu untersuchen, wurde die Effluxhemmung durch Glucose bei unterschiedlichem Anteil an exokriner Verunreinigung der Inselgruppen bestimmt. Da Carpinelli und Malaisse

Einfluß von Glucose (5,6 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 3

Mean +/- SEM

Abb: 4-9

(1981) gezeigt haben, daß der Rubidiumefflux bereits bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM maximal gehemmt ist, wurde für diesen Versuch eine solche Glucosekonzentration gewählt.
Eine Inselgruppe wurde sehr sauber ausgelesen, so daß sie praktisch keine Verunreinigung mit exokrinem Pankreasgewebe enthielt; der zweiten Gruppe wurden etwa 10 %, der dritten Gruppe etwa 50 % exokrine Pankreaspartikel zugesetzt. Die Verunreinigung erfolgte durch Hinzufügen von etwa inselgroßen Pankreaspartikeln nach Augenmaß.

Parameter:	exokrine Verunreinigung keine	10 %	50 %	
Bedingungen				
Vorphase:	3	3	3	mM Glucose
Stimulation:	5,6	5,6	5,6	mM Glucose
Nachlauf:	3	3	3	mM Glucose
Rate Vorphase:	2,2 %	2,2 %	2,2 %	
Rate Stimulation:	1,3 %	1,6 %	1,9 %	
Quotient:	0,6	0,75	0,88	

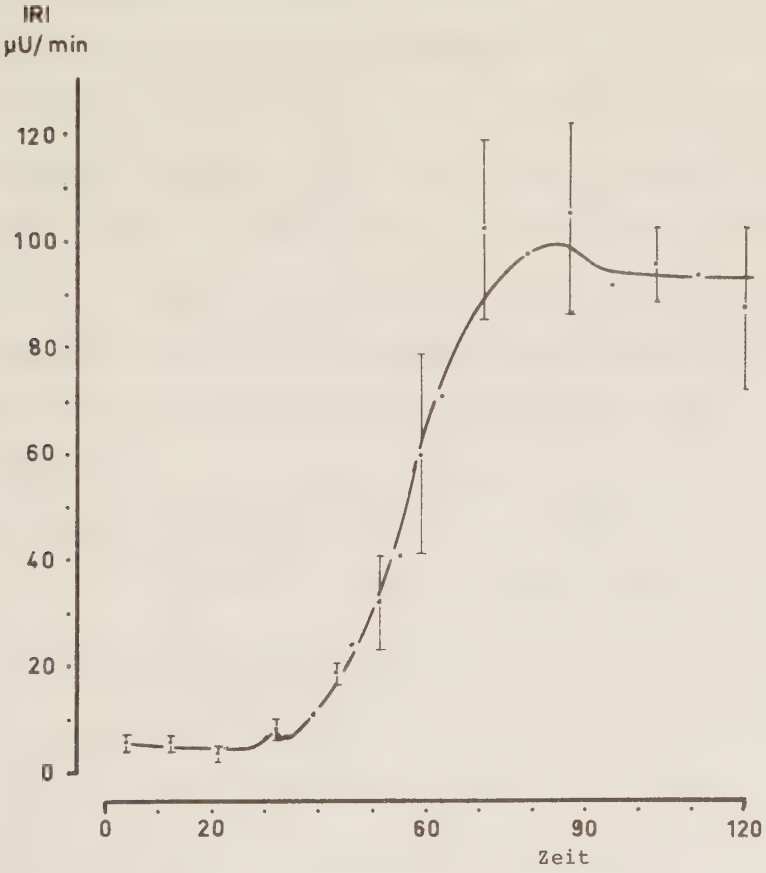
Tab.4-24: Störeinfluß von exokrinen Pankreaspartikeln auf die Hemmung des Rubidiumeffluxes durch Glucose siehe Abb.: 4-9

Bei diesem Versuch zeigt sich deutlich, daß durch exokrines Pankreasgewebe als Verunreinigung der Inselgruppen ein relativ starker Effekt, wie ihn die Effluxhemmung durch Glucose darstellt, fast völlig verschwinden kann. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine kontinuierliche Abgabe von Rubidium durch das exokrine Gewebe im Gegensatz zum glucosegesteuerten Efflux der Insel.

Einfluß von Glucose (16,7 mM) auf die

Insulinsekretion von Ratteninseln

Perifusion



Perifusion: 70 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 3

Mean +/- SEM

Abb.: 4-10

4.4.4 Bestimmung der Insulinsekretion in der Perifusion

Um über Funktionsfähigkeit des Perifusionssystemes eine endgültige Aussage machen zu können, wurde die Insulinsekretion nach Glucosereiz (16,7 mM) gemessen. Hierzu wurden Gruppen von jeweils 70 Inseln zunächst mit 3 mM glucosehaltigem Medium 20 Minuten lang vorperifundiert. In dieser Phase wurden die Fraktionen im 4-Minuten-Abstand gesammelt. Sie lieferten den Wert für die Basalsekretion. Zu Beginn der 20. Minute wurde auf ein Medium mit 16,7 mM Glucose umgeschaltet. Die Fraktionen wurden nun über 15 Minuten als 1-Minuten-Fraktionen, danach bis zum Ende der 90. Minute als 2-Minuten-Fraktionen gesammelt. Die Flowrate betrug 1,2 ml/min. Das Insulin wurde aus dem Effluat direkt mittels RIA bestimmt.
Das gefundene Ergebnis (siehe Abbildung 4-10) entspricht in Bezug auf die Sekretionsleistung und den kinetischen Verlauf den Angaben der Literatur (Henquin und Lambert, 1976).

Mit den bisher beschriebenen Versuchen kann die Funktionsfähigkeit des Systems in vollem Umfang bestätigt werden.

5 Versuchsergebnisse

5.1 Versuchsplanung

Die Untersuchung der Wirkung von DIP, DIP-Salz und GSH auf den Rubidiumefflux wurde mittels Perifusion durchgeführt. Dazu wurde ein nach den Regeln der Statistik randomisierter Versuchsplan aufgestellt. Zur statistischen Auswertung wurde für die unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Kurven eine Varianzanalyse mit anschließendem t-Test (zweiseitig, unverbundene Proben) durchgeführt. Dabei wurde ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Als Vergleich diente eine entsprechend den Perifusionsbedingungen aufgenommene Kurve ohne Untersuchungssubstanz in der Stimulationsphase.
Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind unter 5.5 beschrieben.

5.2 Erstellung der Vergleichskurven

Für die Untersuchung der Wirkung von DIP, DIP-Salz und GSH wurden die folgenden Glucosekonzentrationen gewählt und mit diesen Vergleichskurven aufgenommen:
a) substimulatorische Glucosekonzentration: 3 mM (Kontrolle I)
Bei dieser Glucosekonzentration wurden die Substanzen untersucht, deren Effekte bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration zu erwarten waren. Bei einer Glucosekonzentration von 3 mM im Medium befindet sich der Rubidiumefflux in einem Zustand, bei dem sowohl eine Hemmung als auch eine Steigerung der Effluxrate

Einfluß von Glucose (3 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	2.5362	.2576	.1288
2	2.4523	.1916	.0958
3	2.3699	.2187	.1094
4	2.3572	.2191	.1095
5	2.2776	.1621	.081
6	2.2593	.1693	.0846
7	2.1851	.2091	.1045
8	2.1686	.1417	.0709
9	2.1248	.1536	.0768
10	2.092	.1656	.0828
11	2.1089	.1741	.0871
12	2.0636	.2034	.1017
13	2.0109	.168	.084
14	1.9977	.2058	.1029
15	1.9344	.1635	.0818
16	1.9066	.1853	.0927
17	1.8765	.2255	.1127
18	1.8637	.2197	.1099
19	1.8093	.1565	.0782
20	1.8023	.2068	.1034
21	1.7553	.1804	.0902
22	1.7553	.1931	.0966
23	1.7814	.2793	.1396
24	1.7339	.2606	.1303
25	1.6732	.26	.13
26	1.6513	.2771	.1386
27	1.6099	.2526	.1263
28	1.6414	.2678	.1339
29	1.5973	.3119	.156
30	1.5503	.2863	.1432
31	1.5316	.3412	.1706
32	1.5342	.3385	.1693
33	1.5053	.3282	.1641
34	1.5174	.384	.192
35	1.5303	.3967	.1984

MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
2.1284	.1525	.0762
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.789	.1795	.0897
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
.3395	.1207	.0604
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
.1596	.0576	.0288
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
.8404	.0576	.0288

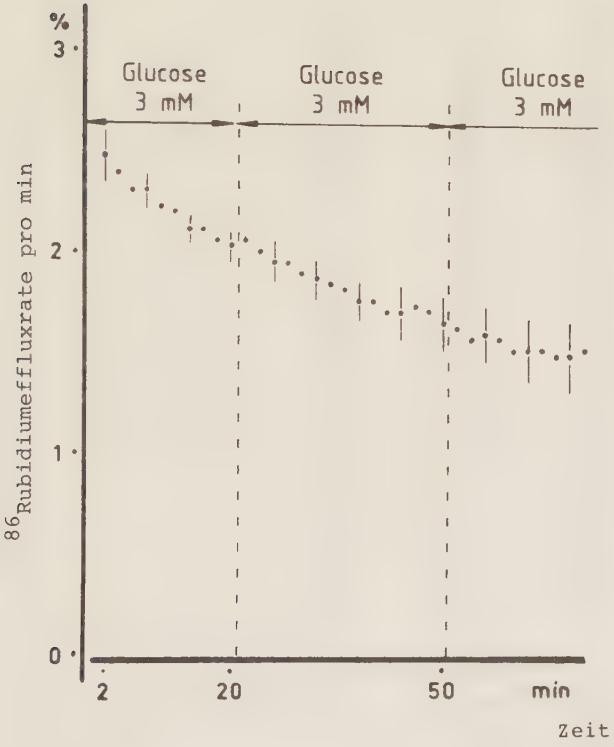
Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-1

Einfluß von Glucose (3 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-1

Einfluß von Glucose (5,6 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	1.4965	.0831	.0415
2	1.3958	.0737	.0368
3	1.3323	.0573	.0286
4	1.3058	.0638	.0319
5	1.2923	.072	.036
6	1.2606	.0355	.0177
7	1.2338	.0291	.0146
8	1.2413	.0396	.0198
9	1.2002	.0639	.032
10	1.1662	.0253	.0127
11	1.1483	.0293	.0147
12	1.1151	.0563	.0282
13	1.1295	.0354	.0177
14	1.1004	.0577	.0288
15	1.0997	.0524	.0262
16	1.0954	.0565	.0282
17	1.0907	.0538	.0269
18	1.0963	.0797	.0398
19	1.0826	.0771	.0385
20	1.0725	.0951	.0475
21	1.0921	.0943	.0471
22	1.0935	.1063	.0531
23	1.0646	.0836	.0418
24	1.083	.0995	.0498
25	1.0847	.1239	.0619
26	1.0829	.1419	.071
27	1.0844	.173	.0865
28	1.0582	.1713	.0856
29	1.0563	.1647	.0823
30	1.0545	.1723	.0861
31	1.0601	.1584	.0792
32	1.0383	.151	.0755
33	1.0394	.175	.0875
34	1.0569	.1668	.0834
35	1.034	.1817	.0908

MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
1.2026	.0386	.0193
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.0824	.0871	.0435
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
.1202	.0782	.0391
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
.1	.0658	.0329
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
.9	.0658	.0329

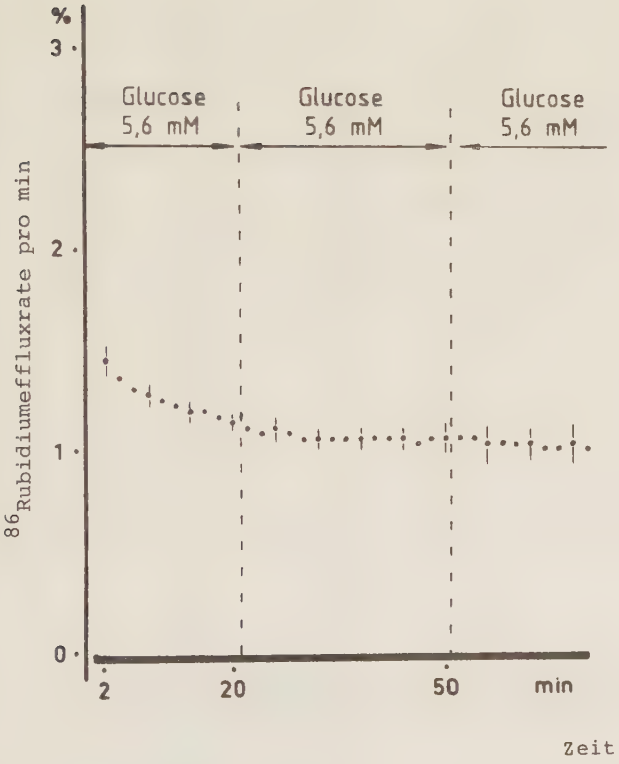
Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-2

Einfluß von Glucose (5,6 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-2

möglich ist, jedoch noch keine stimulatorische Wirkung der Glucose auf das Membranpotential und die Insulinsekretion ausgeht. Tabelle 5-1 und die Abbildung 5-1 zeigen diese Kurve.

b) stimulatorische Glucosekonzentration: 5,6 mM (Kontrolle II)

Nach Carpinelli und Malaisse (1981) ist der Rubidiumefflux bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM bereits maximal gehemmt. Eine stärkere Hemmung ist durch Steigerung der Glucosekonzentration nicht zu erreichen. Da zu befürchten war, daß bei höherer Glucosekonzentration das System bereits so stabil gehemmt ist, daß eine Aufhebung der Hemmung durch die Untersuchungssubstanzen nicht möglich ist, wurde als stimulatorische Glucosekonzentration 5,6 mM gewählt. Diese Kurve zeigen Tabelle 5-2 und Abbildung 5-2.

Um die eventuell auftretenden Effekte der Untersuchungssubstanzen quantitativ mit den durch Veränderung der Glucosekonzentration erzeugten Maximaleffekten vergleichen zu können, wurde die folgende Kurve mit Änderung der Glucosekonzentration (Kontrolle III) aufgenommen:

Vorphase:	5,6 mM Glucose
Stimulationsphase:	3 mM Glucose
Nachlauf:	5,6 mM Glucose

siehe Tabelle 5-3 und Abbildung 5-3

Diese Parameter wurden in den Versuchsplan integriert und konnten somit durch Varianzanalyse ausgewertet werden.

Einfluß der Änderung der Glucosekonzentration

auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln

Verminderung von 5,6 mM auf 3 mM

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	1.6828	.128	.0739
2	1.5636	.1194	.069
3	1.5196	.1011	.0584
4	1.5039	.0922	.0532
5	1.4612	.0923	.0533
6	1.4323	.1079	.0623
7	1.3877	.1171	.0676
8	1.3934	.1264	.073
9	1.392	.0996	.0575
10	1.3686	.1086	.0627
11	1.3438	.1213	.07
12	1.8122	.112	.0647
13	2.6131	.2919	.1685
14	2.5768	.2415	.1394
15	2.3907	.1263	.0729
16	2.3371	.1038	.06
17	2.2884	.0888	.0513
18	2.3138	.09	.052
19	2.295	.0876	.0506
20	2.3142	.0955	.0552
21	2.3014	.0824	.0476
22	2.2199	.0322	.0186
23	2.1786	.096	.0554
24	2.1726	.0756	.0436
25	2.084	.0179	.0103
26	2.0851	.032	.0185
27	1.6651	.2033	.1174
28	1.2153	.1957	.113
29	1.2611	.1861	.1074
30	1.2775	.1617	.0934
31	1.2768	.1978	.1142
32	1.2164	.1567	.0904
33	1.23	.2008	.1159
34	1.2491	.2114	.1221
35	1.2111	.1875	.1083

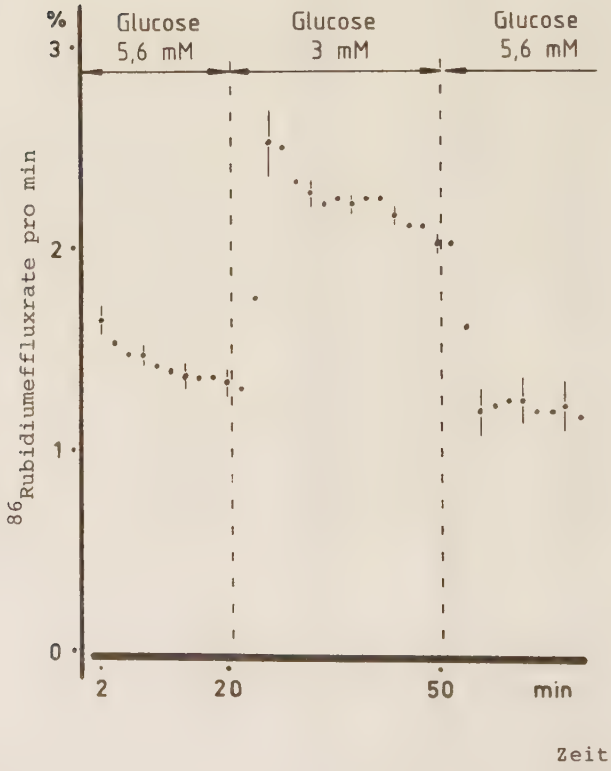
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
1.3847	.1116	.0644
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
2.3035	.0826	.0477
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
-.9188	.1066	.0616
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
-.6696	.126	.0727
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
1.6696	.126	.0727

Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 3

Tab.: 5-3

Einfluß der Änderung der Glucosekonzentration
auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln
Verminderung von 5,6 mM auf 3 mM



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min
Anzahl der Versuche: 3
Mean +/- SEM

Abb.: 5-3

5.3 Untersuchung des Einflusses von DIP und DIP-Salz auf den Rubidiumefflux von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte

Mit dem von Kosower et al. (1974) beschriebenen DIP (siehe 2.3.2) steht eine Substanz zur Verfügung, die durch ihre Membrangängigkeit (Kosower et al., 1974 und 1976) geeignet ist, intrazelluläre Thiole zu oxidieren. Um nachzuweisen, daß eventuelle, nach Anwendung dieser Substanz auftretende Effekte, auch tatsächlich durch intrazelluläre Ereignisse ausgelöst werden, haben Kosower et al. (1974) das durch Methylierung gewonnene (2.3.2), polare DIP-Salz eingeführt. Mit dieser Substanz ist es möglich, membranständige Thiole ohne gleichzeitige Beeinflussung intrazellulärer Thiole zu oxidieren.

5.3.1 Wirkung von DIP auf den Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln der Ratte

Ammon et al. (1983) konnten zeigen, daß durch DIP die Insulinsekretion sowohl bei isolierten Inseln als auch beim perfundierten Pankreas (Kilgus, 1981) bei Anwesenheit von 16,7 mM Glucose dosisabhängig gehemmt wird. Der ATP-Gehalt der Inseln bleibt jedoch bei DIP-Konzentrationen bis 0,5 mM unbeeinflußt (Ammon et al., 1983). Die erwartete Senkung des GSH-Gehaltes und gleichzeitige Erniedrigung des GSH/GSSG Quotienten bei 16,7 mM Glucose konnte Eujen (1979) für eine DIP-Konzentration von 0,1 mM zeigen. Hägele (1981) fand eine dosisabhängige Verringerung der Calciumaufnahme bei Stimulation der Inseln mit 16,7 mM Glucose und DIP.

Einfluß von DIP (0,025 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	1.4716	.1108	.0496
2	1.4186	.079	.0353
3	1.3899	.0706	.0316
4	1.3916	.0568	.0254
5	1.3628	.0679	.0304
6	1.3384	.0385	.0172
7	1.3189	.0348	.0156
8	1.3143	.0327	.0146
9	1.3266	.0149	6.6E-03
10	1.3041	.0424	.0189
11	1.3241	.0235	.0105
12	1.3742	.033	.0148
13	1.3978	.0474	.0212
14	1.4075	.0434	.0194
15	1.4056	.0471	.0211
16	1.4271	.0458	.0205
17	1.4092	.0555	.0248
18	1.4419	.047	.021
19	1.4417	.0574	.0257
20	1.4354	.062	.0277
21	1.4663	.062	.0277
22	1.458	.0549	.0245
23	1.4683	.0547	.0245
24	1.5082	.095	.0425
25	1.4617	.0989	.0442
26	1.4737	.079	.0353
27	1.4542	.069	.0309
28	1.4408	.0563	.0252
29	1.4338	.0837	.0375
30	1.4526	.0303	.0136
31	1.4462	.0643	.0288
32	1.4557	.035	.0157
33	1.4725	.046	.0206
34	1.4746	.0443	.0198
35	1.4744	.0462	.0207

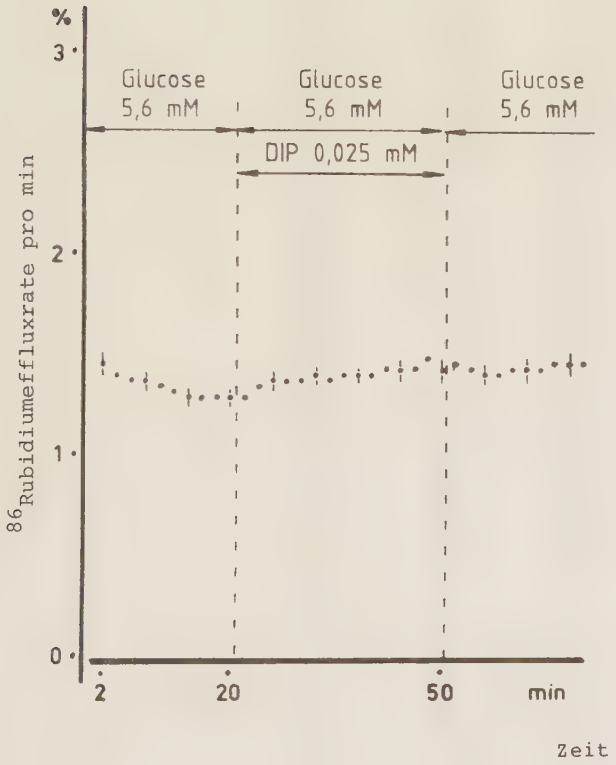
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
1.315	.0242	.0108
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.4478	.0593	.0265
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
-.1328	.049	.0219
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
-.1009	.037	.0165
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
1.1009	.037	.0165

Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 5

Tab.: 5-4

Einfluß von DIP (0,025 mM) auf den
Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 5

Mean +/- SEM

Abb: 5-4

Einfluß von DIP (0,05 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	1.3916	.262	.1172
2	1.3255	.218	.0975
3	1.31	.2269	.1015
4	1.2908	.2209	.0988
5	1.2499	.2035	.091
6	1.2438	.1972	.0882
7	1.2252	.2062	.0922
8	1.214	.1962	.0877
9	1.2039	.2037	.0911
10	1.1977	.1869	.0836
11	1.2107	.2338	.1045
12	1.2994	.2729	.122
13	1.3036	.2202	.0985
14	1.3277	.2397	.1072
15	1.3363	.2397	.1072
16	1.3421	.2406	.1076
17	1.3331	.2495	.1116
18	1.3358	.2562	.1146
19	1.3277	.2263	.1012
20	1.3357	.2427	.1086
21	1.3332	.2511	.1123
22	1.3214	.257	.1149
23	1.3275	.2418	.1081
24	1.3299	.2551	.1141
25	1.329	.2429	.1086
26	1.317	.2722	.1217
27	1.2631	.2408	.1077
28	1.2624	.2737	.1224
29	1.25	.274	.1225
30	1.2627	.2797	.1251
31	1.2605	.2728	.122
32	1.2536	.2639	.118
33	1.2632	.2692	.1204
34	1.266	.2686	.1201
35	1.2625	.2802	.1253
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :			
	1.2052	.1951	.0872
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :			
	1.3322	.2397	.1072
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :			
	-.127	.0607	.0272
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :			
	-.1031	.0397	.0178
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :			
	1.1031	.0397	.0178

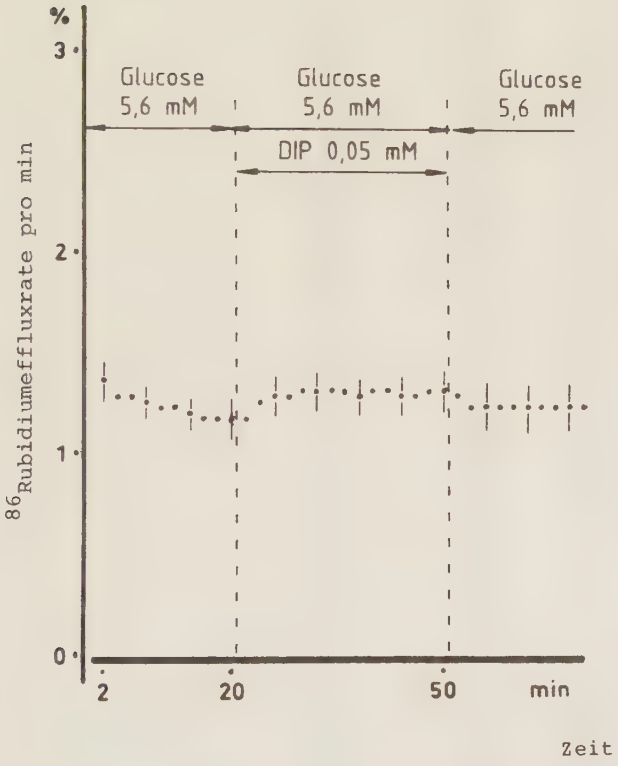
Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 5

Tab.: 5-5

Einfluß von DIP (0,05 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 5

Mean +/- SEM

Abb.: 5-5

Einfluß von DIP (0,1 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	1.3831	.1935	.0968
2	1.3605	.2025	.1012
3	1.2848	.1497	.0749
4	1.2619	.1737	.0868
5	1.2333	.1701	.0851
6	1.2158	.1595	.0798
7	1.2136	.1681	.0841
8	1.208	.1985	.0993
9	1.1653	.1404	.0702
10	1.1759	.1388	.0694
11	1.1669	.1509	.0754
12	1.3899	.1839	.0919
13	1.399	.1921	.0961
14	1.373	.1877	.0938
15	1.3943	.1617	.0808
16	1.3754	.1493	.0746
17	1.3458	.1234	.0617
18	1.3731	.1512	.0756
19	1.361	.1825	.0912
20	1.3629	.1252	.0626
21	1.3663	.1681	.0841
22	1.3855	.1381	.069
23	1.3654	.1584	.0792
24	1.3559	.1629	.0815
25	1.33	.1492	.0746
26	1.3614	.1476	.0738
27	1.2668	.1768	.0884
28	1.2392	.1282	.0641
29	1.208	.0969	.0485
30	1.224	.1315	.0658
31	1.1354	.0924	.0462
32	1.1626	.1079	.054
33	1.1745	.0968	.0484
34	1.1622	.0828	.0414
35	1.1452	.0847	.0423

MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
1.1831	.159	.0795
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.3634	.1579	.0789
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
-.1803	.0282	.0141
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
-.1548	.0345	.0172
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
1.1548	.0345	.0172

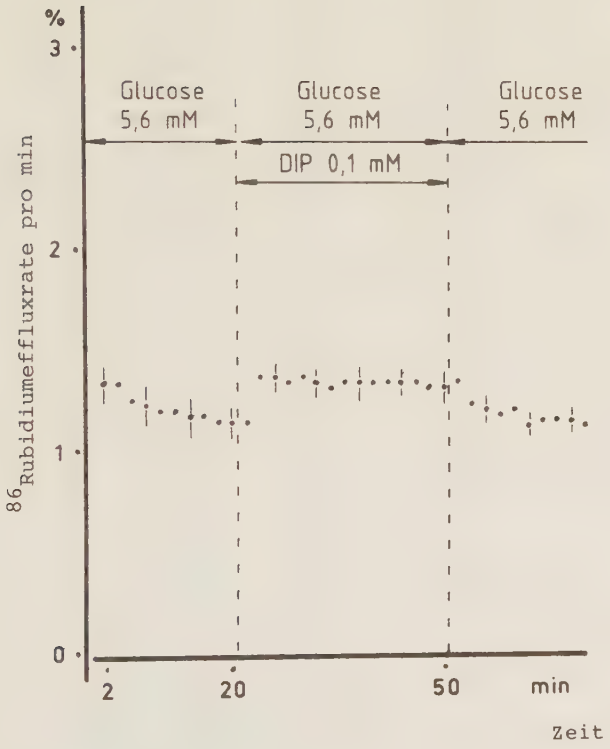
Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-6

Einfluß von DIP (0,1 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-6

Um die Wirkung von DIP auf den ^{86}Rubidiumefflux zu untersuchen, wurde dem Perifusionsmedium während der Stimulationsphase DIP in verschiedenen Konzentrationen (0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) zugesetzt. Die Glucosekonzentration war in allen drei Phasen 5,6 mM (siehe 5.2 b). Nach Ablauf der Stimulationsphase wurde auf ein Medium ohne DIP zurückgeschaltet. Die Tabellen 5-4 bis 5-6 sowie die Abbildungen 5-4 bis 5-6 zeigen nun die Wirkung von drei verschiedenen DIP Konzentrationen (0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) auf den Rubidiumefflux. Dabei zeigt sich deutlich eine dosisabhängige Steigerung des Rubidiumeffluxes, die in vollem Umfang reversibel ist. Beim Vergleich der Effekte mit der Kontrollkurve, vor allem aber mit der Vergleichskurve, bei der von 5,6 mM Glucose auf 3 mM Glucose umgeschaltet wurde, das System also nahezu völlig enthemmt wurde, zeigt sich aber, daß die Steigerung des Rubidiumeffluxes selbst durch 0,1 mM DIP nur etwa 33 % der maximal möglichen Steigerung erreicht.

5.3.2 Wirkung von DIP-Salz auf den Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln der Ratte

Das polare DIP-Salz steigert nach den Befunden von Ammon et al. (1983) bei substimulatorischer Glucosekonzentration die Insulinsekretion von isolierten Inseln, nach den Befunden von Kilgus (1981) die des perfundierten Pankreas. Hägele (1981) findet für DIP-Salz jedoch nur bei einer Konzentration von 0,025 mM eine Steigerung der Calciumaufnahme unter Anwesenheit von 3 mM Glucose. Bei höheren DIP-Salz-Konzentrationen ist dieser Effekt

Einfluß von DIP-Salz (0,025 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	2.4492	.099	.0495
2	2.4529	.0911	.0456
3	2.3257	.0319	.016
4	2.324	.0662	.0331
5	2.2836	.0189	9.5E-03
6	2.2581	.0281	.0141
7	2.1923	.0227	.0113
8	2.1626	.0463	.0232
9	2.1344	.044	.022
10	2.1141	.0774	.0387
11	2.0846	.0714	.0357
12	2.0449	.0565	.0283
13	1.9881	.0945	.0473
14	1.9814	.0883	.0441
15	1.9071	.1133	.0566
16	1.8926	.0738	.0369
17	1.8293	.1134	.0567
18	1.7965	.1148	.0574
19	1.7827	.125	.0625
20	1.7308	.0846	.0423
21	1.7217	.1016	.0508
22	1.6511	.1301	.0651
23	1.617	.1138	.0569
24	1.6275	.1069	.0534
25	1.5528	.1313	.0657
26	1.5638	.2007	.1003
27	1.4955	.1676	.0838
28	1.4726	.1708	.0854
29	1.4706	.1274	.0637
30	1.4293	.191	.0955
31	1.411	.1804	.0902
32	1.3835	.2202	.1101
33	1.3692	.2248	.1124
34	1.3531	.2442	.1221
35	1.3078	.2672	.1336

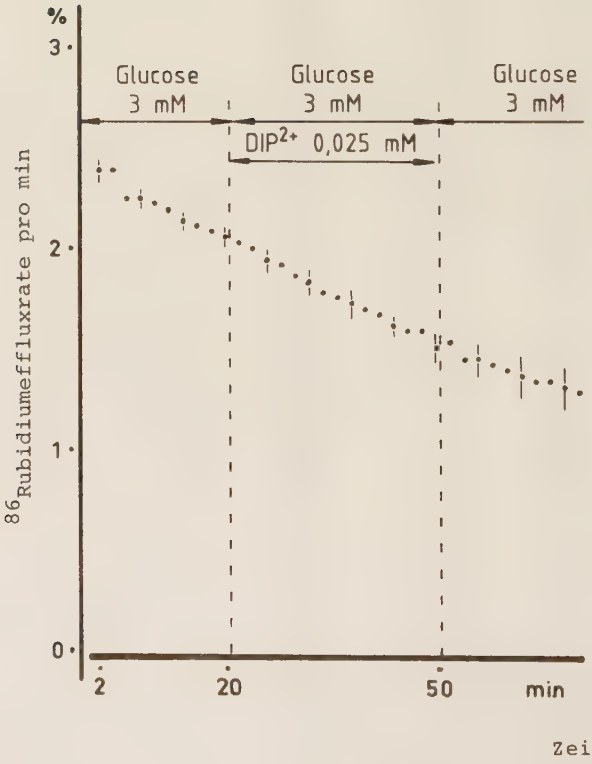
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
2.137	.0534	.0267
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.7451	.1026	.0513
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
.392	.0524	.0262
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
.1839	.0289	.0145
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
.8161	.0289	.0145

Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-7

Einfluß von DIP-Salz (0,025 mM) auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-7

Einfluß von DIP-Salz (0,05 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	2.4839	.2529	.1265
2	2.3518	.3167	.1583
3	2.3166	.2947	.1473
4	2.2493	.2718	.1359
5	2.1878	.2893	.1446
6	2.1555	.2908	.1454
7	2.1248	.3011	.1505
8	2.0516	.2997	.1499
9	2.023	.2806	.1403
10	2.0028	.3103	.1551
11	1.9676	.302	.151
12	1.9214	.3148	.1574
13	1.8936	.3039	.152
14	1.8511	.3013	.1506
15	1.8239	.3283	.1641
16	1.8208	.3924	.1962
17	1.7752	.3361	.1681
18	1.7709	.3643	.1821
19	1.7093	.382	.191
20	1.6624	.3608	.1804
21	1.6552	.3902	.1951
22	1.6097	.3983	.1992
23	1.5988	.4109	.2055
24	1.5592	.3933	.1967
25	1.5374	.4111	.2056
26	1.5342	.4325	.2162
27	1.5305	.4543	.2272
28	1.4754	.445	.2225
29	1.4633	.4659	.233
30	1.4258	.4446	.2223
31	1.4134	.4382	.2191
32	1.4054	.4743	.2372
33	1.3783	.4777	.2389
34	1.3359	.4528	.2264
35	1.3366	.4856	.2428

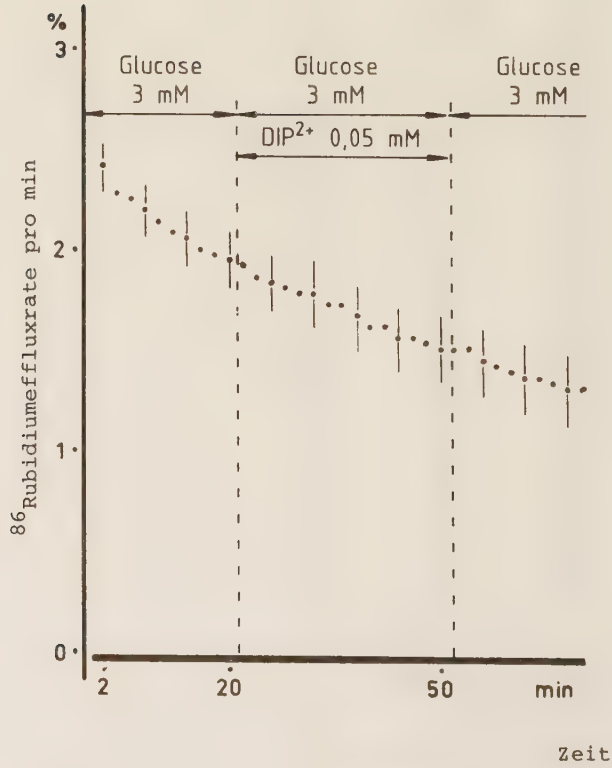
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
2.0258	.2966	.1483
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.6756	.377	.1885
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
.3501	.1322	.0661
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
.1793	.0896	.0448
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
.8207	.0896	.0448

Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-8

Einfluß von DIP-Salz (0,05 mM) auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-8

Einfluß von DIP-Salz (0,1 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	2.4041	.1803	.0902
2	2.32	.1765	.0882
3	2.2875	.171	.0855
4	2.251	.124	.062
5	2.1759	.1509	.0755
6	2.193	.1786	.0893
7	2.1075	.1828	.0914
8	2.0542	.1601	.0801
9	2.0068	.1939	.0969
10	1.9698	.1747	.0873
11	1.9494	.1755	.0878
12	1.877	.2086	.1043
13	1.8192	.1764	.0882
14	1.8341	.1781	.089
15	1.7816	.2172	.1086
16	1.7644	.2059	.1029
17	1.723	.2184	.1092
18	1.6947	.2228	.1114
19	1.66	.2008	.1004
20	1.6493	.2096	.1048
21	1.6318	.2601	.1301
22	1.6044	.1813	.0907
23	1.5975	.2272	.1136
24	1.566	.2109	.1054
25	1.5604	.2501	.125
26	1.5186	.2457	.1229
27	1.5243	.234	.117
28	1.5232	.2325	.1163
29	1.506	.2419	.121
30	1.4629	.2706	.1353
31	1.4603	.2162	.1081
32	1.4382	.2279	.114
33	1.4134	.2094	.1047
34	1.4106	.2043	.1021
35	1.3994	.2173	.1086

MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
2.0103	.172	.086
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.647	.2234	.1117
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
.3632	.0639	.0319
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
.1832	.0445	.0222
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
.8168	.0445	.0222

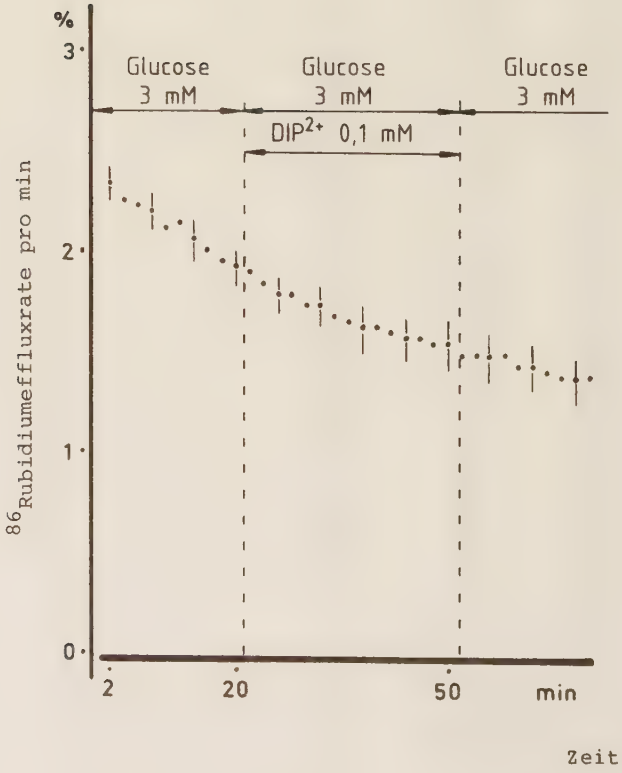
Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-9

Einfluß von DIP-Salz (0,1 mM) auf den

Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-9

nicht zu beobachten. Um den Einfluß von DIP-Salz auf den ^{86}Rubidiumefflux zu untersuchen, wurde während der Stimulationsphase auf ein Medium mit verschiedenen DIP-Salz-Konzentrationen (0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) umgeschaltet. Nach Beendigung der Stimulationsphase wurde, um die Reversibilität der eventuell auftretenden Effekte zeigen zu können, auf ein Medium ohne DIP-Salz zurückgeschaltet. Die Glucosekonzentration war in allen drei Phasen 3 mM (siehe 5.2 a). In den Tabellen 5-7 bis 5-9 sowie den Abbildungen 5-7 bis 5-9 ist aufgezeigt, daß DIP-Salz keinen Einfluß auf den Rubidiumefflux hat.

5.4 Untersuchung der Wirkung von reduziertem Glutathion (GSH) auf den Rubidiumefflux Langerhansscher Inseln der Ratte

Exogenes, reduziertes Glutathion (GSH) steigert nach den Befunden von Ammon et al. (1984) die Insulinsekretion isolierter Inseln nur bei stimulatorischer Glucosekonzentration (11,1 mM), nicht jedoch bei substimulatorischer Glucosekonzentration. Strölin (1983) findet sowohl bei einer Glucosekonzentration von 3 mM als auch bei einer Glucosekonzentration von 16,7 mM eine erhöhte Calciumaufnahme der Inseln bei GSH-Zusatz. Henquin (1980) kann bei Abwesenheit von Glucose im Medium eine Hemmung des Rubidiumeffluxes isolierter Inseln durch Glutathion in hoher Konzentration (10 mM) zeigen. Dieser Effekt trat jedoch bei 3 mM Glucose im Medium nicht mehr auf.
Die von Henquin verwendete GSH-Konzentration (10 mM) ist im Vergleich zu der von Ammon verwendeten Konzentration (0,1 mM)

Einfluß von reduziertem Glutathion (0,1 mM)

auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln

FRAKTION	RATE	SD	SEM
1	2.524	.1547	.0774
2	2.4165	.1769	.0885
3	2.3611	.1418	.0709
4	2.3462	.1577	.0789
5	2.2659	.1484	.0742
6	2.2467	.1575	.0787
7	2.1978	.15	.075
8	2.2735	.2421	.121
9	2.1754	.1739	.0869
10	2.0767	.1617	.0809
11	2.0901	.1693	.0847
12	2.0633	.1397	.0698
13	2.0287	.2	.1
14	2.0493	.1844	.0922
15	1.9761	.1947	.0973
16	1.975	.1943	.0971
17	1.9451	.199	.0995
18	1.9206	.2156	.1078
19	1.8762	.2427	.1213
20	1.8658	.2289	.1145
21	1.8267	.2111	.1056
22	1.8737	.2959	.1479
23	1.7766	.2367	.1183
24	1.7514	.2496	.1248
25	1.7349	.2488	.1244
26	1.723	.2609	.1305
27	1.7048	.2629	.1314
28	1.6554	.2753	.1376
29	1.636	.2422	.1211
30	1.5916	.2635	.1318
31	1.5991	.2327	.1163
32	1.5481	.2467	.1234
33	1.5618	.2706	.1353
34	1.5357	.2663	.1331
35	1.5192	.2996	.1498

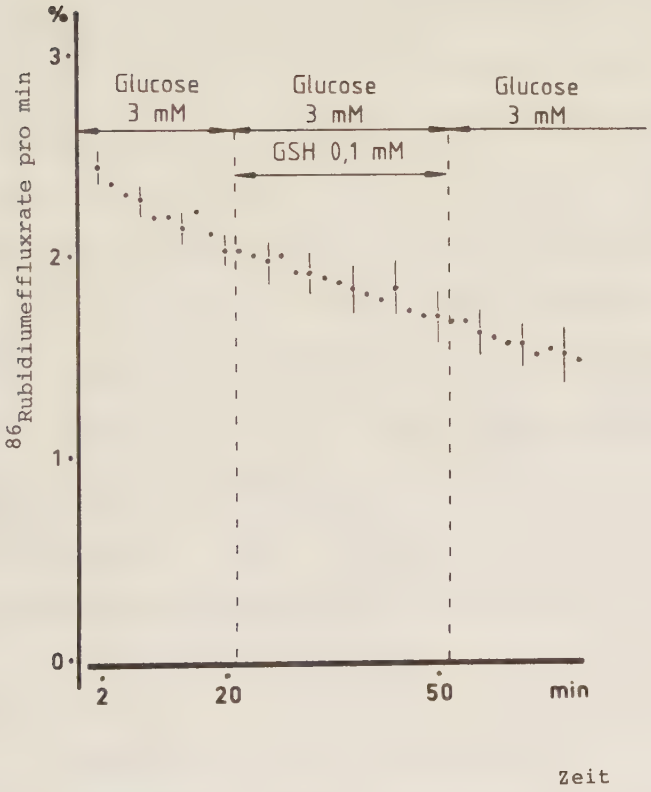
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 8;9;10 :		
2.1752	.1763	.0881
MITTELWERT DER FRAKTIONEN 19;20;21 :		
1.8562	.2269	.1134
MITTELWERT DER DIFFERENZEN :		
.319	.0544	.0272
MITTELWERT DER DIFFERENZQUOTIENTEN :		
.1489	.0382	.0191
MITTELWERT DER QUOTIENTEN :		
.8511	.0382	.0191

Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Tab.: 5-10

Einfluß von reduziertem Glutathion (0,1 mM) auf den Rubidiumefflux bei Ratteninseln



Perifusion: 20 Inseln, Flowrate 1,2 ml/min

Anzahl der Versuche: 4

Mean +/- SEM

Abb.: 5-10

sehr hoch. Abdel Hamid (1983) konnte zeigen, daß die Steigerung der glucoseinduzierten (11,1 mM) Insulinsekretion isolierter Inseln bei einer GSH-Konzentration von 0,1 mM maximal ist, bei Steigerung der GSH-Konzentration auf über 2,0 mM jedoch sogar gehemmt ist. Deshalb sollte hier der Einfluß von reduziertem Glutathion in einer Konzentration von 0,1 mM auf den Rubidiumefflux von isolierten Langerhansschen Inseln bei einer Glucosekonzentration von 3 mM untersucht werden. Da GSH nach den obigen Befunden die Insulinsekretion nur bei stimulatorischer Glucosekonzentration steigert, wäre eine Untersuchung der GSH-Wirkung bei 5,6 mM oder sogar 16,7 mM Glucose notwendig gewesen. Da jedoch der Rubidiumefflux bereits bei 5,6 mM Glucose maximal gehemmt ist, kann eine weitere Hemmung des Effluxes bei dieser Konzentration nicht gezeigt werden. Um dennoch eine Aussage über einen eventuellen Hemmeffekt machen zu können, wurden die Untersuchungen bei einer Glucosekonzentration von 3 mM durchgeführt. Die Tabelle 5-10 und die Abbildung 5-10 zeigen, daß GSH (0,1 mM) bei 3 mM Glucose keinen Einfluß auf den Rubidiumefflux ausübt.

5.5 Auswertung der Versuche

Die Ergebnisse der Einzelversuche wurden, wie vorne beschrieben, mittels Varianzanalyse ausgewertet. Dabei wurden die folgenden Parameter miteinander verglichen:

a) DIP (3 Konzentrationen) mit Glucose 5,6 mM (Kontrolle II)

b) DIP-Salz (3 Konzentrationen) mit GSH (0,1mM) und Glucose 3 mM (Kontrolle I)

c) DIP (0,1 mM) mit der Glucosevergleichskurve mit Konzentrationswechsel von 5,6 mM nach 3 mM (Kontrolle III), jedoch nur durch t-Test (Student).

5.5.1 Versuche mit DIP

Bei den Versuchen mit DIP ergaben sich die folgenden Quotienten und die aus diesen berechnete Steigerung des Effluxes:

Parameter	Quotient Mean +/- SEM	n Anzahl der Versuche	Effekt auf den Rubidiumefflux + = Steigerung - = Hemmung
A) Glucose 5,6 mM (Kontrolle II)	0,900 +/- 0,066	4	0
B) DIP 0,025 mM	1,101 +/- 0,037	5	+ 22,3 %
C) DIP 0,05 mM	1,103 +/- 0,039	5	+ 22,5 %
D) DIP 0,1 mM	1,155 +/- 0,035	4	+ 28,3 %
E) Gluc. 5,6/3 mM (Kontrolle III)	1,669 +/- 0,126	3	+ 85,4 %

Tab. 5-11: Ergebnisse der Versuche mit DIP

Die Unterschiedlichkeit der Quotienten wurde mit einer Varianzanalyse überprüft. Diese ergab einen berechneten Wert $f_b = 54,1$. Der Tabellenwert betrug $f_t = 3,344$. Daraus folgt mit $p < 0,05$, daß sich mindestens zwei Gruppen signifikant unterscheiden. Es wurde ein t-Test nach Varianzanalyse mit erweiterter Zahl an

Freiheitsgraden durchgeführt (Ther, 1965).

Parameter	Signifikanz
B) vs A)	$p < 0,001$
C) vs A)	$p < 0,001$
D) vs A)	$p < 0,001$
C) vs B)	n.s.
D) vs B)	$p < 0,05$
D) vs C)	$p < 0,1$

Tab. 5-12: Statistische Auswertung der Versuche mit DIP

Um eine Aussage über die quantitative Wirkung der wirksamsten DIP-Konzentration (0,1 mM) machen zu können, wurde diese Kurve mit der Glucosevergleichskurve mit Konzentrationswechsel von 5,6 mM auf 3 mM (Kontrolle III) verglichen. Dabei ergab sich, daß die Wirkung von DIP (0,1 mM) etwa 33,4 % der maximal möglichen Wirkung erreicht.

Statistik:

D) vs E) $p < 0,001$ (t-Test nach Student)

5.5.2 Versuche mit DIP-Salz und GSH

Da bei den Versuchen mit DIP-Salz und mit GSH von beiden Stoffen eine extrazelluläre Wirkung auf das Thiolgleichgewicht der Membran zu erwarten war und beide Substanzen unter gleichen Bedingungen sowie im selben Versuchsblock untersucht wurden, konnten sie in einer gemeinsamen Varianzanalyse ausgewertet werden.

Parameter	Quotient Mean +/- SEM	n Anzahl der Versuche	Effekt auf den Rubidiumefflux + = Steigerung - = Hemmung
A) Glucose 3 mM (Kontrolle)	0,840 +/- 0,058	4	keiner
B) DIP-Salz 0,025 mM	0,816 +/- 0,029	4	keiner
C) DIP-Salz 0,05 mM	0,821 +/- 0,090	4	keiner
D) DIP-Salz 0,1 mM	0,817 +/- 0,045	4	keiner
E) GSH 0,1 mM	0,851 +/- 0,038	4	keiner

Tab. 5-13: Ergebnisse der Versuche mit DIP-Salz und GSH

Statistik:

Die statistische Auswertung erfolgte für diese Gruppe ebenfalls mittels Varianzanalyse. Es ergab sich ein berechneter Wert für f_b = 0,284. Bei berechneten Werten für f < 1 gilt die Nullhypothese für das Kollektiv als bestätigt, das heißt, keiner der in diesem Kollektiv untersuchten Parameter unterscheidet sich in seiner Wirkung vom anderen, etwaige Unterschiede der Werte sind auf zufällige Ereignisse zurückzuführen.

6 Diskussion

6.1 Bedeutung des Kaliums

Das Kalium dient in der Zelle zum einen der Aufrechterhaltung des intrazellulären Turgors, zum anderen ist es an der Entstehung von Ruhe- und Aktionspotentialen beteiligt. Bei den meisten Zellen wird das Kalium über eine membranständige K / Na -ATP'ase im Austausch gegen Natrium in die Zelle eingeschleust. Dies geschieht unter Energieaufwand und entgegen einem Konzentrationsgefälle. Dabei wird das Kalium in der Zelle bis zum 10-fachen der physiologischen Außenkonzentration - bei der ß-Zelle der Langerhansschen Insel bis zum 44-fachen - konzentriert (Sehlin und Täljedahl, 1974). Kaliumionen können im Normalfall die Zellmembran von innen nach außen leicht permeieren, Natriumionen in umgekehrter Richtung nur sehr schwer. Für die konjugierten Anionen ist die Zellmembran jedoch undurchlässig, so daß in der Zelle ein durch die Kaliumdiffusion bedingtes, negatives Potential entsteht. Daß trotz der leichten Permeationsfähigkeit für Kalium eine so hohe intrazelluläre Konzentration entstehen kann, ist auf die große Aktivität der K / Na- Pumpe zurückzuführen (Rein und Schneider, 1973).

Wird die Zelle gereizt, so kommt es zu einem Aktionspotential, das heißt, das ursprünglich negative Potential der Zelle fällt spontan auf Null ab und steigt in den positiven Bereich an. Ursache hierfür ist eine starke, spontane Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran für Natriumionen, die entsprechend dem Konzentrationsgefälle massiv in die Zelle einströmen (Rein und

Schneider, 1973).

Die Langerhansschen Inseln besitzen zur Bildung des Aktionspotentiales einen etwas anderen Mechanismus. Zwar wird auch bei diesen Zellen das Ruhepotential durch den Ausstrom von Kalium, dem Kaliumefflux, gebildet, das Aktionspotential gliedert sich jedoch in zwei Teile, wobei der eine Teil Kalium-, der andere Teil Calciumfluxen zugeordnet wird (Meissner und Schmelz, 1974). Dabei ist nach der Reizung zunächst ein schwaches Ansteigen des Potentiales, bedingt durch eine Hemmung des Kaliumeffluxes, zu beobachten, danach ein schneller Anstieg, bedingt durch den massiven Calciumeinstrom. Das Aktionspotential der Langerhansschen Inseln steigt jedoch niemals auf positive Werte an, es bleibt immer unter 0 V (Meissner et al., 1974, 1978).

Für die Untersuchung der Rolle des Kaliums bei der Insulinsekretion, vor allem jedoch der Beeinflußbarkeit der Sekretionsauslösung über Veränderungen beim Entstehen des Aktionspotentiales durch Änderung der Kaliumpermeabilität, ist die Bestimmung des Kaliumeffluxes durch Messung des ^{86}Rubidiumeffluxes nach vorheriger Beladung der Inseln mit dem radioaktiven Tracer eine geeignete Methode.

6.2 Versuche zur Messung des Rubidiumeffluxes

6.2.1 Beladung der Inseln mit radioaktivem ^{86}Rubidium

Voraussetzung für die Messung des Rubidiumeffluxes ist, die Inseln bis zum Erreichen einer Sättigung mit ^{86}Rubidium zu beladen.

Dabei bestand die Bedingung, daß die Inseln in einer Form in das Inkubationsmedium gebracht wurden, die es erlaubte, nach Beendigung des Beladungsvorganges die Inseln aus dem Medium herauszunehmen und vollständig von der anhaftenden Radioaktivität zu befreien. Dies war notwendig, um im Anschluß an die Beladung die Messung des Effluxes durchführen zu können. Dies sollte durch die Verwendung der von Hägele (1981) beschriebenen Netzgefäße erreicht werden. Im Verlauf der Versuche zeigte sich dann aber, daß das im Inkubationsmedium vorhandene Albumin offensichtlich unspezifisch Radioaktivität an die Netze und den Träger band und somit für hohe und uneinheitliche Backgroundwerte verantwortlich war. Diese ließen sich auch durch dreimaliges Waschen nicht reduzieren, wobei eine zweimalige Waschung keine schlechteren Ergebnisse lieferte. Die Waschungen sollten jedoch nicht allzu intensiv durchgeführt werden, da befürchtet wurde, daß der dadurch zu früh einsetzende Efflux die späteren Ergebnisse zu sehr beeinflussen würde. Es wurde also versucht, die Beladung der Inseln bei Abwesenheit von Albumin durchzuführen. Dies war nach der von Sehlin et al. (1974) beschriebenen Methode möglich, wurde von diesem jedoch nur mit Inseln durchgeführt, die durch Microdissection gewonnen wurden. Die Inkubation ohne Albumin brachte dann auch stark verbesserte Backgroundwerte. Die Versuchsergebnisse zeigten jedoch, daß bei den durch Collagenaseverdauung des exokrinen Pankreas gewonnenen Inseln das Erreichen eines steady-state nicht möglich war, da die Inseln nach 30 Minuten Inkubationsdauer zwar ein Maximum zeigten, danach jedoch das aufgenommene Rubidium sogar im Inkubationsmedium wieder verloren und so

der Rubidiumgehalt der Insel wieder absank. Dieser Effekt blieb auch nach Zusatz von Dextran noch erhalten, so daß osmotische Gründe für sein Entstehen nicht verantwortlich sein können. Es fiel bei den Versuchen auf, daß die Inseln bei Aufbewahrung in einem albuminfreien Medium offenbar ihre Fähigkeit zur Akkumulation von Rubidium zeitabhängig verloren. Deshalb wurde versucht, Aufschlüsse über die Rolle des Albumins im Inkubationsmedium zu gewinnen. Dazu wurde als Beurteilungsparameter zunächst die Insulinsekretion herangezogen. Es zeigte sich, daß die Inseln durchaus in der Lage waren, nach der Aufbewahrung in einem albuminfreien Medium und Umsetzen in ein albuminhaltiges, eine normale Insulinsekretion nach Glucosereiz zu leisten. Die Bestimmung der Insulinsekretion direkt im albuminfreien Medium war nicht möglich, da in diesem Medium, wie aus der entsprechend hergestellten Eichkurve für den RIA deutlich zu ersehen war, ein Teil des sezernierten Insulins entweder bereits während der Inkubation abgebaut wurde oder an die Gefäßwände adsorbiert wurde und somit nicht bestimmt werden konnte. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß eine Verminderung der Albuminkonzentration im Medium von ursprünglich 2 % auf jetzt 0,5 % die Insulinsekretion nicht beeinflußt. Offensichtlich sind Aufnahme und Abgabe von Rubidium durch die Insel Vorgänge, die erheblich empfindlicher als der Parameter Insulinsekretion auf Veränderungen in den Inkubationsmedien reagieren. So ist es denkbar, daß das Albumin nicht nur eine Rolle bei der Absättigung der Gefäßwände mit Protein spielt und deshalb in einem Medium ohne Albumin die Insulinsekretion nicht nach der Doppelantikörpermethode gemessen werden kann, sondern, daß ihm auch eine Bedeutung bei der Pufferung der auf

der Basis des Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffers erstellten Medien zukommt. Dies wird dadurch bestätigt, daß eine deutliche Verbesserung der Rubidiumaufnahme beziehungsweise das Erreichen des steady-state erst dann möglich war, als die Pufferung der Medien durch Zusatz von HEPES deutlich verbessert wurde. Darüber hinaus wurde die Methode zur Isolierung der Inseln so abgewandelt, daß ein Schock der Inseln durch eiskalte Medien nicht mehr stattfand (Lernmark, 1971).

6.2.2 Messung des Rubidiumeffluxes

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, zunächst in einem statischen System den Rubidiumefflux zu bestimmen. Dazu wurden die Inseln zunächst mitsamt dem Netzgefäß nach der Beladung mit ^{86}Rubidium in das Effluxmedium gestellt und die an das Medium abgegebene Menge Radioaktivität gemessen. Dabei zeigte sich, daß durch die Netzgefäße auch nach intensiver Waschung sehr große Mengen an Radioaktivität in das Effluxmedium verschleppt wurden und so der eigentliche Efflux nicht mehr messbar war (Tab.: 4-15). Um diese Störungen zu beseitigen, wurde die Bestimmung des Inselrestgehaltes nach der Effluxphase und die entsprechende Rückberechnung des Effluxes durchgeführt, beziehungsweise, bei anderen Versuchen das Netz mit den Inseln vom Träger abgezogen und alleine in das Effluxmedium gegeben. Bei beiden Versionen war zur Effluxratenberechnung die Kenntnis des Ausgangsgehaltes der Inseln notwendig, der über eine separate Aufnahmegruppe in jedem Versuch bestimmt wurde. Auch diese Änderungen der Methode führten

zu keiner spürbaren Verbesserung der Ergebnisse (Tab.: 4-20). Die Ursache hierfür war, daß sich der Efflux unmittelbar nach der Beendigung der Beladungsphase noch nicht normalisiert hatte und deshalb eine Hemmung durch Glucose nicht im in der Literatur beschriebenen Umfang möglich war. Diese Equilibrierung dauert mindestens 5 Minuten. Deshalb wurde vor dem Einsetzen der Inseln in das eigentliche Effluxmedium eine 5 Minuten dauernde Praeefflux-phase eingeführt, mit der die Normalisierung des Effluxes vor Beginn der Untersuchungsphase erreicht werden sollte. Das Hauptproblem bei den bisher beschriebenen Modifikationen der Effluxmessmethode war jedoch, daß für die Berechnung der Effluxraten eine getrennte Aufnahmegruppe erforderlich war. Diese Aufnahmegruppen zeigten eine relativ starke Streuung, wobei dann noch erschwerend hinzu kam, daß der Efflux ja nicht von dieser Gruppe bestimmt wurde, sondern von einer anderen. Ursache für diese Streuungen war einerseits die unterschiedliche Größe der Inseln, andererseits die Tatsache, daß zwar immer 20 Inseln in ein Gefäß eingelesen wurden, jedoch nicht sichergestellt werden konnte, ob auch alle 20 Inseln aktiv am Beladungsvorgang teilnahmen. Für die Berechnung wären aber möglichst identische Ausgangswerte bei der Aufnahmegruppe und der Effluxgruppe notwendig gewesen. Diese Anforderung wurde jedoch nicht erfüllt, so daß es bei einzelnen Experimenten zu einer rechnerischen Umkehrung der Ergebnisse kam. Eine deutliche Verbesserung der Versuchsergebnisse konnte erst erreicht werden, als zur Bestimmung des Ausgangswertes (Gehalt der Inselgruppe nach der Beladung) der Inselrestgehalt nach Beendigung des Effluxes herangezogen wurde. Dies war durch eine

Anordnung möglich, bei der nur die Netze mit den Inseln in das Effluxmedium gegeben wurden. Nach der Beendigung der Effluxphase wurde das Außenmedium bis auf einen definierten Rest abpipettiert und hieraus der Efflux bestimmt. Nach Volumenkorrektur konnten der Ausgangsgehalt und die Effluxrate aus diesem Wert und dem Restgehalt berechnet werden. Bei statistischer Auswertung dieser Versuche (Tab.: 4-21) ergab sich dann auch eine der Literatur entsprechende Hemmung des Rubidiumeffluxes durch Glucose (Sehlin 1974). Allerdings waren die Streuungen der einzelnen Ergebnisse immer noch verhältnismäßig hoch.

Der wesentliche Nachteil einer statischen Methode zur Effluxmessung ist jedoch, daß die Untersuchung der durch die Testsubstanzen verursachten zeitlichen Veränderungen des Effluxes nur mit großem Aufwand zu bewerkstelligen sind, da für jeden untersuchten Zeitpunkt eine Inselgruppe (20 Inseln) notwendig ist. Auch ist es nicht möglich, Substanzen während der Untersuchung aus dem Medium zu entfernen, um so die Reversibilität der Wirkung zeigen zu können. Aus diesen Gründen wurde die Rubidiumeffluxmessung in einem dynamischen System durch Perifusion von Inseln durchgeführt. Mit dieser Methode, von Henquin (1974, 1978) beschrieben, läßt sich der Efflux einer Inselgruppe (40 Inseln) über eine beliebige Zeitspanne hinweg beobachten. Dabei ist es möglich, durch eine entsprechende Konstruktion des Systemes sowie durch das Sammeln von zeitlich begrenzten Effluatfraktionen, die Änderung des Effluxes nach der Zugabe der Untersuchungssubstanzen und auch nach deren Entfernung aus dem Medium zu beobachten. Gleichzeitig ist diese Methode durch die Bestimmung des Inselrestgehaltes nach der Perifusion und Rückberechnung des Ausgangsgehaltes

von der Zahl und der Größe der eingesetzten Inseln weitgehend unabhängig.

6.3 Thiolabhängigkeit des Rubidiumeffluxes

6.3.1 Stellung der Kaliumpermeabilität in der Sekretionskaskade

Die Glucose wird von der ß-Zelle der Langerhansschen Insel über einen Hexosecarrier in der Membran in das Innere der Zelle gebracht. Dort wird sie, wie Malaisse et al. (1981) zeigen konnten, sofort der Metabolisierung zugeführt. Dabei scheint der Glycolyse vor allem die Rolle des Energielieferanten durch die ATP-Bildung zuzukommen. Der hierfür wesentliche Teil der Glycolyse ist der Abbau des Glycerinaldehyd-3-phosphates zum Pyruvat. Dies erkärt, weshalb für die Auslösung der Insulinsekretion auch D-Glycerinaldehyd verwendet werden kann. Der Abbau der Glucose durch den Pentosephosphatshunt, der in sehr viel geringerem Maße abläuft als die Glycolyse, führt zur Bildung von NADPH. Das Vorhandensein der reduzierten Pyridinnukleotide ist für die Hemmung des Kaliumeffluxes notwendig (Henquin, 1980). Der Kaliumefflux, der für die Bildung des Ruhepotentiales verantwortlich ist, wird kurz nach dem Ansteigen des Lactat- und Pyruvatausstoßes, das heißt unmittelbar nach dem Beginn des Glucosemetabolismus (Malaisse et al., 1981) gehemmt. Dies führt zu einem langsamen Ansteigen des Membranpotèntiales. Hat dieses eine bestimmte Schwelle erreicht, so wird die Zellmembran für Calciumionen durchlässig. Dadurch wird der Einstrom von Calcium in die Zelle verstärkt, es kommt zu

einem Ansteigen der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und somit zur Auslösung der elektrischen Aktivität. Dieser Schritt vermittelt dann die Freisetzung von Insulin. Allerdings scheint der Kaliumefflux von der Glycolyse unabhängig zu sein, da durch Jodacetamid die Glycolyse blockiert werden kann, die Hemmung des Kaliumeffluxes durch Glucose jedoch unbeeinflußt bleibt (Sehlin und Täljedahl, 1974).

Dem Kaliumefflux kommt also im wesentlichen eine einleitende Funktion bei der Bildung des Aktionspotentiales zu, gleichzeitig ist er für die Regulation der Membranpermeabilität für Calcium verantwortlich. Dabei unterliegt der Kaliumefflux aber auch noch einer Rückregulation durch den Calciumeinstrom, dem wahrscheinlich ein Regelmechanismus zugrunde liegt, der die Zelle vor der Bildung eines positiven Hyperpolarisationspotentiales schützt (Lebrun et al., 1982; Meissner und Schmelz, 1974).

6.3.2 Einfluß der Thiole auf die Sekretionskaskade

6.3.2.1 Oxidation intrazellulärer Thiole mit DIP

Die Oxidation intrazellulärer Thiole mit DIP, t-BHP oder Diamid führt zu einer Verkleinerung des GSH/GSSG-Quotienten und als Folge zu einer verminderten Insulinsekretion nach Glucosereiz (Ammon et al., 1977, 1979, 1983). Die Calciumaufnahme nach Glucosereiz ist bei einer Oxidation der intrazellulären Thiole ebenfalls reduziert. Dies gilt sowohl für die Oxidation durch DIP (Ammon et al., 1983) als auch durch Diamid oder t-BHP (Hägele,

1981). Der Rubidiumefflux wird, nach den Befunden dieser Arbeit, durch DIP dosisabhängig gesteigert (Tab.: 5-4 bis 5-6). Diese Steigerung fällt jedoch im Vergleich zu der bei Wechsel der Glucosekonzentration von 5,6 mM auf 3 mM zu beobachtenden Effluxsteigerung erheblich geringer aus. Die nach Oxidation intrazellulärer Thiole beobachtete Verminderung der Calciumaufnahme ist jedoch im Gegensatz hierzu so ausgeprägt, daß bei Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen die Aufnahme nicht mehr über den Basalwert der Calciumaufnahme bei substimulatorischer Glucosekonzentration hinausgeht (Ammon et al., 1983). Die Ursache für diese vermeintliche Diskrepanz in der Wirkungsstärke ist, daß durch die Steigerung des Kaliumeffluxes nach der Oxidation der intrazellulären Thiole das für die Auslösung der elektrischen Aktivität notwendige Schwellenpotential (Meissner und Schmelz, 1974) durch Ausbleiben einer genügenden Effluxhemmung nicht erreicht wird. Dadurch bleibt die Zellmembran undurchlässig für Calcium, die Calciumaufnahme kann nicht gesteigert werden, die elektrische Aktivität der Zelle unterbleibt. Diese Theorie kann durch Befunde von Henquin (1980) bestätigt werden, die zeigen, daß bei Oxidation der intrazellulären Thiole mit t-BHP der Kaliumefflux ebenfalls gesteigert wird. Auch das t-BHP hemmt die durch Glucose induzierte Steigerung der Calciumaufnahme und die Insulinsekretion. Allerdings war dessen Wirkung sehr viel stärker als die durch DIP verursachte. Der Grund hierfür könnte die Tatsache sein, daß t-BHP in der von Henquin (1980) verwendeten Konzentration (0,2 mM) den ATP-Gehalt der Insel stark verringert, während DIP in der hier eingesetzten Konzentration (max. 0,1 mM)

den ATP-Gehalt der Insel nicht beeinflußt (Ammon, unveröffentlichte Daten und Ammon, 1983).

Die Wirkung der hier beschriebenen Thioloxidantien beschränkt sich jedoch nicht auf die intrazellulären Thiole, sondern sie oxidieren die extrazellulären Thiole ebenfalls. Da diesen extrazellulären Thiolen jedoch auch eine Bedeutung bei der Insulinsekretion zukommt (Ammon et al., 1980, 1983) und sie nach den Beobachtungen von Kosower et al. (1982) in enger Beziehung zum intrazellulären Thiolsystem stehen, ist es notwendig, das extrazelluläre Thiolsystem ohne Beeinflussung des intrazellulären Thiolsystemes zu untersuchen. Dies ist mit dem polaren DIP-Salz möglich, das nur in sehr geringem Maße in die Zelle eindringen kann, die Membranthiole jedoch analog der intrazellulären Wirkung von DIP oxidiert (Kosower et al., 1974). Es wurde deshalb die Wirkung des DIP-Salzes auf den Rubidiumefflux untersucht.

6.3.2.2 Oxidation extrazellulärer Thiole mit DIP-Salz

Die Beeinflussung extrazellulärer, membranständiger Thiole durch pCMB oder pCMBS führt zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Dabei kommt es zu einer Mercaptidbildung dieser Substanzen mit den Membran-SH-Gruppen (Hellmann et al., 1974). Mit den SH-Reagenzien DTMB oder CPDS kann ebenfalls eine Insulinsekretion ausgelöst werden. Diese Verbindungen oxidieren wahrscheinlich benachbarte Thiolgruppen und führen somit zur Bildung von Disulfidbrücken (Grasetti, 1969).

Um die Bedeutung des Redoxzustandes der Membranthiole zu untersu-

chen, wurden diese mit DIP-Salz oxidiert (Kosower et al., 1974). Dabei werden der GSH- und der ATP-Gehalt der Zelle bei den verwendeten DIP-Salz-Konzentrationen (max. 0,1 mM) nicht beeinflußt. Es zeigte sich, daß nach der Oxidation der Membranthiole bei Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosekonzentration die Insulinsekretion gesteigert ist und, bei niedriger DIP-Salz-Konzentration (0,025 mM), die Calciumaufnahme erhöht wird (Ammon et al., 1983). Bei stimulatorischer Glucosekonzentration war kein Effekt sichtbar. Um genauere Aussagen über die Lokalisation des Angriffspunktes der Membranthiole in der Sekretionskaskade machen zu können, wurde in dieser Arbeit der Einfluß von DIP-Salz auf den Rubidiumefflux untersucht. Da die Beeinflussung der Membranthiole nur bei substimulatorischer Glucosekonzentration einen Effekt auf die Calciumaufnahme und die Insulinsekretion hat, wurden die Rubidiumeffluxmessungen ebenfalls unter diesen Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das DIP-Salz, unabhängig von den untersuchten Dosierungen (0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) keinen Effekt auf den Rubidiumefflux besitzt (Tab.: 5-7 bis 5-9). Dies läßt den Schluß zu, daß der Rubidiumefflux nicht der Regulation über Membranthiole, wohl aber der Regulation durch intrazelluläre Thiole unterliegt.

6.3.2.3 Einfluß von exogen zugesetztem reduziertem Glutathion auf den Rubidiumefflux

Ammon et al. (1984) konnten zeigen, daß die glucoseinduzierte Insulinsekretion durch den Zusatz von reduziertem Glutathion

gesteigert werden kann. Dies gilt auch für die Stimulation der Insulinsekretion mit D-Glycerinaldehyd oder Leucin. Allerdings ist der Effekt nur bei einer stimulatorischen Konzentration dieser Substanzen sichtbar, bei substimulatorischer Konzentration dagegen nicht. Im Gegensatz hierzu stehen die Befunde von Strölin (1983), wonach die Calciumaufnahme der Insel sowohl bei stimulatorischer wie auch bei substimulatorischer Glucosekonzentration durch exogen zugesetzes GSH gesteigert werden kann. Als Mechanismus dieser Sekretionssteigerung kann diskutiert werden, daß das GSH entweder Disulfidbrücken mit den Membranthiolen eingeht und dadurch deren Redoxzustand verändert, oder aber doch eine Aufnahme von GSH in die Zelle durch die depolarisierte Membran stattfindet und hierdurch der intrazelluläre GSH/GSSG-Quotient erhöht wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß von exogen zugesetztem reduziertem Glutathion auf den Rubidiumefflux untersucht werden. Dabei bestand das Problem, daß, als Konsequenz aus den obigen Befunden, GSH unter Umständen zu einer Hemmung des Rubidiumeffluxes führen könnte. Ein solcher Effekt kann jedoch bei einer Glucosekonzentration, die größer als 5,6 mM ist, nicht mehr gemessen werden, da bei dieser Glucosekonzentration der Rubidiumefflux bereits maximal gehemmt ist. Deshalb wurde für die Untersuchung des reduzierten Glutathions als Glucosekonzentration 3 mM gewählt, da bei dieser Glucosekonzentration sowohl eine Hemmung wie auch eine Steigerung des Rubidiumeffluxes messbar ist. Darüber hinaus wäre nach den Befunden von Strölin (1983) auch eine Beeinflussung des Rubidiumeffluxes bei substimulatorischer Glucosekonzentration denkbar.

Der Rubidiumefflux wurde jedoch bei 3 mM Glucose durch 0,1 mM GSH

nicht beeinflußt (Tab.: 5-10). Dies wird durch Befunde von Henquin (1980) bestätigt, wonach exogen zugesetztes GSH in einer Konzentration von 10 mM bei Abwesenheit von Glucose zwar zu einer sehr schwachen Hemmung des Rubidiumeffluxes führt, dieser Effekt bei einer Glucosekonzentration von 3 mM jedoch nicht mehr zu beobachten ist. Aus diesem Ergebnis läßt sich ableiten, daß der Kaliumefflux nicht durch exogen zugeführte Thiole beeinflußt werden kann und auch nicht vom Oxidationszustand der Membranthiole abhängig ist.

6.4 Einordnung der Rolle der Thiole und des Rubidiumeffluxes in die Sekretionskaskade

Aus dem bisherigen Stand der Forschung und den hier gewonnenen Ergebnissen ergibt sich der folgende Zusammenhang zwischen dem Kaliumefflux und der Regulation der Insulinsekretion durch Thiole:
Die Metabolisierung der Glucose führt über die Glycolyse zur Bildung einer "Auslösesubstanz", die unterhalb des Trioseniveaus entsteht. Gleichzeitig wird über den Pentosephosphatshunt NADPH gebildet und so der Redoxquotient der intrazellulären Pyridinnukleotide erhöht (Panten et al., 1973, 1976). Durch das NADPH werden intrazelluläre Thiole reduziert und somit freies GSH gebildet, das seinerseits die Membranthiole in den reduzierten Zustand versetzen kann (Hellmann et al., 1974). Durch die Erhöhung der NADPH-Konzentration wird die Hemmung des Rubidiumeffluxes vermittelt (Henquin, 1980). Eine Oxidation der intrazellu-

lären Thiole führt, unter Umständen über einen Rückkopplungsmechanismus, zur Abnahme der NADPH-Konzentration und somit zu einer Steigerung des Kaliumeffluxes. Dadurch kommt es zu einer relativen Polarisation der Zellmembran, das heißt, da das Schwellenpotential für die Auslösung der elektrischen Aktivität nicht erreicht wird, unterbleibt die Steigerung der Calciumaufnahme und damit auch die Insulinsekretion. Wird das Thiolsystem über extrazelluläre Thiole beeinflußt, so kann kein Einfluß auf den Rubidiumefflux festgestellt werden. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß die Oxidation der extrazellulären Membranthiole vom intrazellulären Thiolsystem aufgefangen wird und keinen Einfluß auf die NADPH-Konzentration besitzt. Im Gegensatz hierzu wird jedoch die Calciumaufnahme direkt durch das extrazelluläre Thiolsystem beeinflußt. Die Schritte in der Sekretionskaskade, die nach der Calciumaufnahme liegen, sind jedoch vom Redoxzustand der Thiole unabhängig (Strölin, 1983).

Allerdings sind der NADPH/NADP- und der GSH/GSSG-Quotient nur zur Regulation, nicht aber zur Auslösung der Kaliumeffluxhemmung fähig. Dies zeigen die Befunde mit D-Glycerinaldehyd, der den Rubidiumefflux hemmt (Henquin, 1980), den NADPH-Gehalt der Insel jedoch nicht beeinflußt (Panten et al., 1976). Dies könnte auch erklären, weshalb der Zusatz von NADPH bei Abwesenheit von Glucose den Rubidiumefflux nicht beeinflußt, die Erhöhung der intrazellulären NADPH-Konzentration durch Pentobarbital bei einer Glucosekonzentration von 3 mM jedoch zu einer Hemmung des Rubidiumeffluxes führt (Henquin, 1980). Den intrazellulären Redoxverhältnissen kommt also offensichtlich eine Bedeutung bei der Regu-

lation der Empfindlichkeit des Rubidiumeffluxes gegenüber den Stimulatoren der Insulinsekretion zu.

Die bis heute bekannten Befunde über die thiolabhängige Regulation der Insulinsekretion sind im folgenden Schema zusammengefaßt:

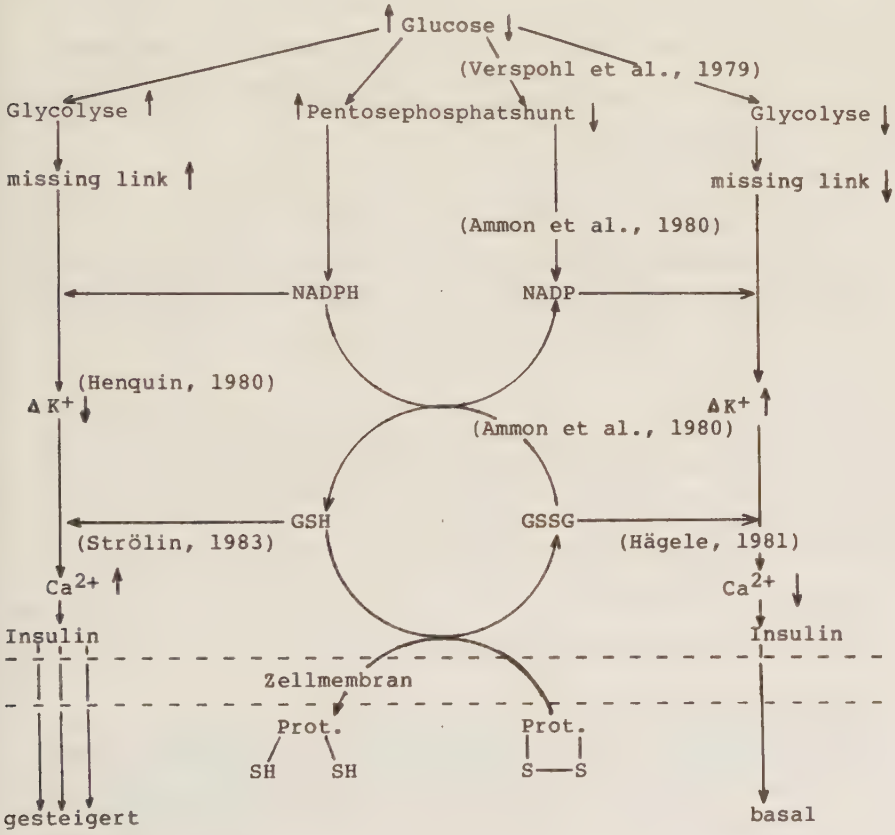


Abb. 6-1: Regulation der Sekretionskaskade bei Glucosereiz durch das intrazelluläre und extrazelluläre Thiolsystem

6.5 Zusammenfassung

6.5.1 Fragestellung

1. Zur Bestimmung des Kaliumeffluxes von Langerhansschen Inseln der Ratte sollte eine geeignete Meßmethode installiert werden. Dazu wurde zuerst versucht, mit ^{86}Rubidium als Tracer für Kalium den Efflux in einem statischen Inkubationssystem zu bestimmen. Danach wurde ein dynamisches Perifusionssystem (nach Henquin, 1974, 1978) eingerichtet.

2. Bei Langerhansschen Inseln der Ratte sollte untersucht werden, ob der Kaliumefflux durch Oxidation intrazellulärer und extrazellulärer Thiole beeinflußt werden kann und ob exogen zugesetztes GSH eine Wirkung auf den Kaliumefflux hat.

3. Basierend auf den Befunden unseres Arbeitskreises sollte untersucht werden, an welcher Stelle der Sekretionskaskade die Regulation durch Thiole stattfindet oder ob Thiole nur bei bestimmten Schritten der Sekretionskaskade eine Bedeutung haben.

6.5.2 Ergebnisse des methodischen Teiles

1. Bei der Beladung der Inseln mit dem radioaktiven Tracer zeigte sich, daß die Aufnahmefähigkeit und das Haltevermögen der Inseln für ^{86}Rubidium in hohem Maße von den im Inkubationssystem herrschenden Bedingungen bezüglich der pH-Stabilität, der Temperatur und der Zusammensetzung des Mediums abhängig sind.

2. Mit der Methode, den Efflux auf statische Weise durch Inkubation zu bestimmen, konnte zwar der in der Literatur beschriebene Hemmeffekt der Glucose (Sehlin und Täljedahl, 1974) auf den Rubidiumefflux nachvollzogen werden, die Methode erschien jedoch für die geplanten Untersuchungen zu ungenau. Es wurde deshalb ein Perifusionssystem eingerichtet.

6.5.3 Versuchsergebnisse

1. Der ^{86}Rubidiumefflux kann, bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose, durch das membrangängige Thioloxidans DIP (Diazodicarbonsäure-N'-(methylpiperazid)), das den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten senkt, in geringem Umfang konzentrationsabhängig gesteigert werden.

2. Das nicht membrangängige, polare DIP-Salz, das durch Methylierung von DIP gewonnen wird, oxidiert nur außenständige Membranthiole. Der intrazelluläre GSH/GSSG-Quotient wird durch DIP-Salz nicht beeinflußt. Bei einer Glucosekonzentration von 3 mM besitzt das DIP-Salz in den hier verwendeten Konzentrationen (0,025 mM bis 0,1 mM) keinen Effekt auf den Rubidiumefflux.

3. Exogen zugeführtes reduziertes Glutathion beeinflußt in einer Konzentration von 0,1 mM bei Anwesenheit von 3 mM Glucose den ^{86}Rubidiumefflux ebenfalls nicht.

6.5.4 Schlußfolgerungen

1. Der Redoxzustand des intrazellulären GSH/GSSG-Systems besitzt einen Einfluß auf den Kaliumefflux. Die Oxidation intrazellulärer Thiole führt dabei zu einer Steigerung des ^{86}Rubidiumeffluxes, der als Modell für den Kaliumefflux untersucht wurde.

2. Die Oxidation von extrazellulären, membranständigen Thiolen führt nicht zu einer Beeinflussung des ^{86}Rubidiumeffluxes.

3. Die exogene Zufuhr von reduziertem Glutathion hat ebenfalls keinen Einfluß auf den ^{86}Rubidiumefflux.

4. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß der Kaliumefflux der Langerhansschen Insel, der den Auslösemechanismus für die elektrischen Aktivitäten der ß-Zelle darstellt, der Regulation durch den Redoxzustand intrazellulärer Thiole unterliegt. Der Redoxzustand extrazellulärer Thiole hat keinen Einfluß auf den Kaliumefflux.

7 Literatur

Abdel Hamid M.A. (1983):
Zur Rolle von Thiolen bei der Freisetzung von Insulin und der Bildung von cAMP in der Langerhansschen Insel der Ratte
Dissertation Tübingen

Agren A., Berne C., Brolin S.E. (1978):
The activity of glutathion reductase in A_2-cell and b-cell-rich pancreatic islets
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 427-429

Akhtar M.S., Verspohl E.J., Hegner D., Ammon H.P.T. (1977):
Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin
Diabetes 26, 857-863

Ammon H.P.T., Patel T.N., Steinke J. (1973):
The role of the pentose phosphate shunt in glucose-induced insulinrelease: In vitro studies with 6-aminonicotinamide, methylene blue, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic rat islets.
Biochim. Biophys. Acta 297, 352-367

Ammon H.P.T., Verspohl E.J. (1976):
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon H.P.T., Akhtar M.S., Niklas H. and Hegner D. (1977):
Inhibiton of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide, and tert.-butyl hydroperoxide
Molecular Pharmacology 13, 598-605

Ammon H.P.T., Akhtar M.S., Grimm A. and Niklas H. (1979):
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-96

Ammon H.P.T., Grimm A., Lutz S., Wagner-Teschner D., Händel M. and Hagenloh I. (1980):
Islet glutathion and insulin release
Diabetes 29, 830-834

Ammon H.P.T., Hägele R., Youssif N. (1980 b):
Inhibition of calcium uptake of rat pancreatic islets by thiol oxidants
62nd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington D.C. (Abstract F 783)

Ammon H.P.T., Hoppe E., Eujen R., Lutz S. (1981):
Effect of leucine on GSH levels of rat pancreatic islet
Hormone and metabolic research 13, 60-61

Ammon H.P.T., Abdel Hamid M. (1981 b):
Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated perfused pancreas
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317, 262-267

Ammon H.P.T., Heinzl S., Abdel Hamid M., Kallenberger H.-M. and Hagenloh I. (1982):
Effect of diamide and reduced glutathion on the elevated levels of cyclic AMP in rat pancreatic islets exposed to glucose, p-chloromercuribenzoate and aminophylline
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 243-248

Ammon H.P.T, Hägele R., Youssif N., Eujen R., El-Amri N. (1983):
A possible role of intracellular calcium uptake and insulin release
Endocrinology 112, 720-726

Ammon H.P.T., Bumiller G., Düppenbecker H., Heinze E., Lutz S., Verspohl E.J. (1983 b):
Pentose phosphate shunt, pyridine nucleotides, glutathion, and insulin secretion of fetal islets
Am. J. Physiol. 244,

Ammon H.P.T., Abdel Hamid M., Rao P.G., Enz G. (1984):
Thiol dependent and non thiol dependent stimulations of insulin release
Diabetes, in press

Ashby J.P., Speake R.N. (1975):
Insulin and glucagon secretion from isolated islets of Langerhans. The effect of calcium ionophores
Biochem. J. 150, 89-96

Ashcroft S.J.H., Randle P.J. (1970):
Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets
Biochem. Journal 119, 5-15

Ashcroft S.J.H., Hedeskov C.J., Randle P.J. (1970 b):
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets
Biochem. Journal 118, 143-154

Ashcroft S.J.H., Basset J.M., Randle P.J. (1972):
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets
Diabetes 21, Suppl. 2, 538-545

Ashcroft S.J.H., Weerasinghe L.C.C., Basset J.M., Randle P.J. (1972 b):
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets
Biochem. Journal 126, 525-532

Ashcroft S.J.H., Randle P.J., Täljedahl I.B. (1972 c):
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets
FEBS Letters 201, 263-266

Ashcroft S.J.H., Weerasinghe L.C.C., Randle P.J, (1973):
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release
Biochem. Journal 132, 223-231

Ashcroft S.J.H. (1979):
Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis
Diabetologia 18, 5-15

Atwater I., Dawson C.M., Ribalet B., Rojas E. (1979):
Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic ß-cell
J. Physiol. (Lond.) 288, 575-588

Berglund O., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1978):
$^{86}Rb^{+}$ Fluxes and K^{+} -stimulated nitrophenyl phosphatase activity in the pancreatic islets of genetically diabetic mice (C57BL/KsJ-db/db)
Diabetologia 15, 191-195

Berglund O., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1980):
Influence of the murine diabetes gene on rubidium ion efflux from perifused islets
Diabeologia 19, 45-49

Bonting S.L. (1970):
Sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase and cation transport.
In: "Membranes and ion transport", Vol. 1, ed. Bittar E.F., pp 257-363, London: Wiley-Interscience

Boschero A.C., Kawazu S., Duncan G., Malaisse W.J. (1977):
Effect of glucose on K^{+} handling by pancreatic islets
FEBS Letters 83, 151

Boschero A.C., Malaisse W.J. (1979):
Stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. XXIX. Regulation of $^{86}Rb^{+}$ efflux from perifused islets
Amer. Physiol. Soc. 363, E139

Brisson G.R., Malaisse-Lagae F., Malaisse W.J. (1972):
The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. VII. A proposed site of action for adenosine-3'-5'-cyclic monophosphate
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Bukowiecki L., Freinkel N. (1976):
Relationship between ionic calcium and phosphorus during excitation of pancreatic islets with glucose
Biochim. Biophys. Acta 436, 190-198

Carpinelli A.R., Malaisse W.J. (1980):
Regulation of rubidium outflow from pancreatic islets: II. Effect of changes in extracellular and intracellular pH.
Diabeté et Metabolisme 6, 193

Carpinelli A.R., Malaisse W.J. (1980 b):
Regulation of ^{86}Rb outflow from pancreatic islets.
IV. Effect of cyclic AMP, dibutyrylic-cyclic AMP and theophylline
Acta diabet. lat. 17, 199-205

Carpinelli A.R., Malaisse W.J. (1981):
Regulation of ^{86}Rb outflow: The dual effect of nutrient secretagogues
J. Physiol. (Lond.) 315, 143-156

Charles S., Tamagawa T., Henquin J.C. (1982):
A single mechanism for the stimulation of insulin release and $^{86}Rb^{+}$ efflux from rat islets by cationic amino acids
Biochem. J. 208, 301-308

Dean P.M., Matthews E.K. (1968):
Electrical activity in pancreatic islet cells
Nature 219, 389-390

Dean P.M., Matthews E.K. (1970):
Glucose-induced activity in pancreatic islet cells
J. Physiol. (Lond.) 210, 255-64

Dluhy R.G., Axelrod L., Williams G.H. (1972):
Serum immunoreactive insulin and growth hormone response to potassium infusion in man
J. Appl. Physiol. 33, 22-26

Dunham E.T., Glynn I.N. (1961):
Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions
J. Physiol. (Lond.) 156, 274-293

Eujen R. (1979):
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin
Dissertation Tübingen

Formby B., Capito K., Egeberg J., Hedeskov C.J. (1976):
Ca-activated ATP-ase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets
Am. J. Physiol. 230, 441

Frankel B.J., Kromhout J.A., Imagawa W., Landahl H.D., Grodsky G.M. (1978):
Glucose stimulated ^{45}Calcium uptake in isolated rat islets
Diabetes 27, 365-369

Goldner M.G., Zarowitz H., Agkun S. (1960):
Hyperglycaemia and glucosuria due to thiazide derivates administered in diabetes mellitus
New Engl. J. Med. 262, 403-405

Grasetti D.R. (1969):
Some biochemical effects of thione-forming disulfids and their use in the study of cell thiols
Ann. Ist. Sup. Sanita 5, 645

Grill V., Cerasi E. (1975):
Glucose induced cAMP accumulation in rat islets of Langerhans: preferential effect of the α-anomer.
FEBS Letters 54, 80-83

Grodsky G.M., Bennett L.L. (1966):
Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas
Diabetes 15, 910-913

Gwirstman H.E., Meltzer H.L., Dunner D.L., Fieve R.R., Pierson R.N. (1980):
Rubidium replacement of total body potassium in humans
Horm. Metab. Res. 12, 175

Gylfe E., Hellman B. (1978):
Calcium and pancreatic cell function. 2. Mobilisation of glucose sensitive ^{45} Calcium from perifused islets rich in B-cells
Biochim. Biophys. Acta 538, 249-257

Hahn H.J., Gylfe E., Hellman B. (1979):
Glucose-dependent effect of methylxanthines on the ^{45}Ca distribution in pancreatic B-cells.
FEBS Letters 103, 348-351

Hägele R.G. (1981):
Einfluß extrazellulär und intrazellulär wirkender Thioloxidantien auf die ^{45}Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte
Dissertation Tübingen

Hanks J.H., Wallace E.R. (1949):
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196

Hedeskov C.J., Capito K. (1974):
The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets
Biochem. J. 140, 423-433

Hedeskov C.J., Capito K., Thams P. (1983):
Effects of glucose and other secretagogues on the cytosolic ratios of free NADH/NAD^+ and free NADPH/$NADP^+$ in mouse pancreatic islets
Diabetologia 25, 163 (Abstr. 164)

Hellman B., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1971):
Calcium uptake by pancreatic B-cells as measured with the aid of ^{45}Ca and mannitol-^{3}H
Am. J. Physiol. 221, 1795-1801

Hellman B., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1972):
The intracellular pH of mammalian pancreatic ß-cells
Endocrinology 90, 335-337

Hellman B., Idahl L.A., Lernmark A., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1973):
Role of thiol groups in insulin release: studies with poorly permeating disulphides
Mol. Pharmacol. 9, 792

Hellman B., Idahl L.A., Lernmark A., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1974):
Membrane sulfhydryl groups and pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues
in: Diabetes. Malaisse W.J., and Pirart J., Eds. 65-68, Excerpta Medica, Amsterdam

Hellman B., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1976):
Effects of glucose on ^{45}Ca uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method
J. Physiol. (Lond.) 254, 639-656

Hellman B. (1977):
Mechanism of insulin secretion
in: Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism
ed. Esman V., Oxford, Pergamon 42, 41-50

Hellman B., Lenzen S., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1977 b):
Effect of various modifiers of insulin release on the Lanthanum-non-displaceable $^{45}Ca^{2+}$ uptake by isolated pancreatic islets
Diabetologia 13, 49-53

Hellman B., Andersson T. (1978):
Calcium and pancreatic B-cell function. 4. Evidence that glucose and phosphate stimulate ^{45}Calcium incorporation into different intracellular pools
Biochim. Biophys. Acta 541, 483-491

Henquin J.C., Lambert A.E. (1974):
Cationic environment and dynamics of insulin secretion.
II. Effect of a high concentration of potassium
Diabetes 23, 933-942

Henquin J.C., Lambert A.E. (1976):
Potassium ions and insulin release
J. Physiol. Paris 72, 747-756

Henquin J.C. (1977):
Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 551-556

Henquin J.C. (1978):
D-Glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells
Nature 271, 271-273

Henquin J.C. (1978 b):
Metabolic control by sugars of the potassium permeability (PK) of pancreatic islet cells
Diabetologia 15, 239

Henquin J.C., Meissner H.P. (1978 c):
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of the electrical properties of pancreatic B-cells
Biochim. Biophys. Acta 543, 455-464

Henquin J.C. (1979):
Opposite effects of intracellular Ca^{++} and glucose on K^{+} permeability of pancreatic islets
Nature 280, 66

Henquin J.C., Malvaux P., Lambert A.E. (1979 b):
Alloxan-induced alteration of insulin release, rubidium efflux and glucose metabolism in rat islets stimulated by various secretagogues
Diabetologia 16, 253-260

Henquin J.C. (1980):
Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells
Biochem. Journal 186, 541

Henquin J.C. (1980 b):
The potassium permeability of pancreatic islet cells: Mechanisms of control and influence on insulin release
in: Biochemistry and Biophysics of the pancreatic-B-cell, European Workshop Brussels 1979, 66-73, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Thieme-Stratton Inc. New York

Henquin J.C. (1980 c):
Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: Studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets
Diabetologia 18, 151-160

Henquin J.C., Meissner H.P. (1981):
Effects of amino acids on membrane potential and $^{86}Rb^{+}$ fluxes in pancreatic ß-cells
Am. J. Physiol. 240, E245-E252

Henquin J.C. (1981 b):
The effect of pH on ^{86}Rubidium efflux from pancreatic islet cells
Mol. Cell. Endocrin. 21, 119-128

Henquin J.C., Meissner H.P. (1982):
Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on $^{86}Rb^{+}$ fluxes and membrane potential in pancreatic B cells
Biochem. Pharmacol. 31, 1407-1415

Henquin J.C., Meissner H.P., Schmeer W. (1982 b):
Cyclic variations of glucose induced electrical activity in pancreatic ß-cells
Eur. J. Physiol. 393, 322-327

Herchuelz A., Malaisse W.J. (1978):
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: Dissociation between calcium and insulin release
J. Physiol. (Lond.) 283, 409-424

Herchuelz A., Thonnart N., Sener A., Malaisse W.J. (1980):
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: The role of membrane depolarisation
Endocrinology 107, 491

Herchuelz A., Malaisse W.J. (1980 b):
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: Two calcium movements dissociated response to glucose
Am. J. Physiol. 238, E 87-E 95

Hille B. (1968):
Charges and potentials at the nerve surface.
Divalent ions and pH
J. Gen. Physiol. 51, 221-236

Hodgkin A.L. (1951):
The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle
Biol. Rev. 26, 339-409

Howell S.L., Taylor K.W. (1968):
Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated in vitro
Biochem. J. 108, 17-24

Howell S.L., Tyhurst M. (1982):
Microtubules, microfilaments and insulin secretion
Diabetologia 22, 301-308

Idahl L.A., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1978):
Effects of valinomycin on Rb^+ fluxes, ATP content and insulin release in pancreatic islets
Acta endocrinologica Kbh 88, 113

Kilgus G. (1981):
unveröffentlichte Daten
Diplomarbeit Tübingen

Kosower N.S, Kosower E.M., Wertheim B., Correa W.S. (1969):
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593-596

Kosower E.M., Kosower N.S., Kenety-Londner H., Levy L. (1974):
Glutathion IX. New thiol-oxidizing agents: DIP, DIP^{+}, DIP^{2+}
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 347-351

Kosower E.M., Kenety-Londner H. (1976):
Glutathione 13. Mechanism of thiol oxidation by diazenedicarboxlic acid derivates
J. Am. Chem. Soc. 98:10, 3001-3007

Kosower N.S., Zipser Y., Faltin Z. (1982):
Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells
Relationship to cellular glutathione
Biochim. Biophys. Acta, 691, 345-352

Kuo W.N., Hodgins D.S., Kuo J.F. (1973):
Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents
J. Biol. Chem.248, 2705-2711

Lacy P.E, Kostianovsky M.D. (1967):
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas
Diabetes 16, 35

Lacy P.E. (1975):
Endocrine secretory mechanisms
Amer. J. Path. 79, 170-187

Lambert A.E., Jeanrenaud B., Junod A. and Renold A.E. (1969):
Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and other agents
Biochim. Biophys. Acta 174, 540-553

Lambert A.E., Henquin J.C., Malvaux P. (1974):
Cationic environment and dynamics of insulin secretion.
I. Effect of low concentrations of sodium
Endocrinology 95, 1069-1077

Lebrun P., Malaisse W.J., Herchuelz A. (1982):
Paradoxical activation by glucose of quinine-sensitive potassium channels in the pancreatic B-cell
Biochem. Biophys. Res. Comm. 107, 350-356

Leclerque-Meyer V., Marchand J., Leclerque R., Malaisse W.J. (1976):
Glucagon and insulin release by the in vitro perfused rat pancreas. Influence of the colloid composition of the perfusate
Diabeté et Metabolisme 2, 57

Lenzen S. (1978):
Effects of α-ketocarboxylic acids on $^{45}Ca^{++}$ uptake and insulin secretion by pancreatic ob/ob mouse islets
Diabetologia 15, 249

Lernmark A., Hellman B. (1970):
Effect of epinephrine and mannoheptulose on early and late phases of glucose-stimulated insulin release
Metabolism 19, 614-618

Lernmark A. (1971):
Isolated mouse islets as a model for studying insulin release
Acta Diabetologia Lat. 8, 649-679

Lernmark A., Sehlin J., Täljedahl I.B. (1975):
The use of dispersed pancreatic islet cells in measurements of transmembrane transport
Analytical Biochemistry 63, 73

Little-Dike E.T., Witzel D.A., Whipp S.C. (1968):
Insulin: Evidence for inhibiton of release in spontaneous hypocalcaemia
Proc. Soc. exp. Biol. 129, 135-139

Löffler G., Kemmler W. (1975):
Cation dependent ATPase in rat islet cell membranes
Diabetologia 11, 359

Malaisse W.J., Lea M.A., Malaisse-Lagae F. (1968):
The effect of mannoheptulose on the phosphorylation of glucose and the secretion of insulin by islets of Langerhans
Metabolism 17, 126-132

Malaisse W.J., Brisson G., Malaisse-Lagae F. (1970):
The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. I. Interactions of epinephrine and alkaline earth cations
J. Clin. Exp. Med. 76, 895-902

Malaisse W.J. (1973):
Insulin secretion: Multifactorial regulation for a single release process
Diabetologia 9, 167-173

Malaisse W.J., Brisson G.R., Baird L.E. (1973 b):
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release X. Effect of glucose on ^{45}Calcium efflux from perifused islets
Am. J. Physiol. 224, 389-394

Malaisse W.J., Devis G., Herchuelz A., Sener A., Somers G. (1976)
Calcium antagonists and islets function. VIII. The effect of magnesium
Diabete Metab. 2, 1-4

Malaisse W.J., Herchuelz A., Levy J., Sener A. (1977):
Calcium antagonists and islets function. III. The possible site of action of verapamil
Biochem. Pharmacol. 26, 735-740

Malaisse W.J., Boschero A.C., Kawazu S., Hutton J.C. (1978):
The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release XXVII: Effect of glucose on K^+ fluxes in isolated islets
Eur. J. Physiol. 373, 237

Malaisse W.J., Sener A., Boschero A.C., Kawazu S., Devis G., Somers G. (1978 b):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas
Eur. J. Biochem. 87, 111-120

Malaisse W.J., Hutton J.C., Kawazu S., Herchuelz A., Valverde I., Sener A. (1979):
The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events
Diabetologia 16, 331-341

Malaisse W.J., Carpinelli A.R., Sener A. (1981):
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Timing of early metabolic, ionic, and secretory events
Metabolism 30, 527-532

Malaisse W.J., Sener A., Malaisse-Lagae F. (1981 b):
Insulin release: reconciliation of the receptor and metabolic hypotheses
Mol. Cell. Biochem. 37, 157-165

Mann M.D., Becker D.J., Primstone B.L., Hansen J.D.L. (1975):
Potassium supplementation, serum immunoreactive insulin concentrations and glucose tolerance in protein-energy malnutrition
Br. J. Nutr. 33, 55-61

Mannervik B., Axelsson K. (1978):
in: Functions of glutathion in liver and kidney
Sies H., Wendel A., Eds. Proceedings in life sciences 1978.
Berlin, Heidelberg, New York, Springer, pp 148-153

Marcum J.M., Dedman J.R., Brinkley B.R., Means A.R. (1978):
Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 75, 3771-3775

Meissner H.P., Schmelz H. (1974):
Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets
Pflügers Arch. 351, 195-206

Meissner H.P., Henquin J.C., Preissler M. (1978):
Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic ß-cells
FEBS-Letters 94, 87-89

Milner R.D.G., Hales C.N. (1968):
Cations and the secretion of insulin
Biochim. Biophys. Acta 150, 165-167

Montague W. (1977):
Cyclic nucleotides, calcium and insulin secretion.
in: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanisms of action.
eds. Cramer H., Schultz J., London, New York, Toronto
Wiley & Sons, 133-146

Niki A., Niki H., Koide T. (1982):
Effects of forskolin on insulin release and cAMP level in rat pancreatic islets
in: Alberti K.G.M.M., Ogada T., Alnoch J.A., Mnqola E.N. (eds.)
Proceedings of the 11th Congress of the international Diabetes Federation. ICS 577 Excerpta medica, Amsterdam, 171 (Abstract)

Panten U., Christians J., von Kriegstein E., Poser W., Hasselblatt A. (1973):
Effects of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets
Diabetologia 9, 477-482

Panten U., Ishida H., Beckmann J. (1976):
Effects of d-glyceraldehyd and 3-O-methylglucose upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets
Hormone Res. 7, 164-171

Randle P.J., Ashcroft S.J.H., Gill J.H. (1968):
Carbohydrate metabolism and release of hormones
in: Dickens F., Randle P.J., Whelan W.J. (Eds.) Vol. 1
Academic Press, London, 427-447

Rein H., Schneider M. (1973):
Einführung in die Physiologie des Menschen
Berlin, Heidelberg, New York, Springer 1973

Ribalet B., Beigelman P.M. (1980):
Calcium action potentials and potassium permeability activation in pancreatic ß-cells
Am. J. Physiol. 239, 124-133

Sagild U., Andersen V., Andreasen P.B. (1961):
Glucose tolerance and insulin responsiveness in experimental potassium depletion
Acta Med. Scand. 196, 243-251

Schäfer H. (1980):
Zellcalcium und Zellfunktion
Veröffentlichungen aus der Pathologie 109,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Schrager P. (1974):
Ionic conductance changes in voltage clamped crayfish
axons at low pH
J. Gen. Physiol. 64, 666-690

Sehlin J., Täljedahl I.B. (1974):
Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets
J. Physiol. 242, 505

Sehlin J., Täljedahl I.B. (1975):
Glucose induced decrease in Rb^+ permeability in
pancreatic ß-cells
Nature 253, 635

Sener A., Hutton J.C., Kawazu S., Boschero A.C., Somers G.,
Devis G., Herchuelz A., Malaisse W.J. (1978):
The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin re-
lease. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets
J. Clin. Invest. 62, 868-875

Snyder P.J., Kaskhet S., O'Sullivan J.B. (1970):
Pentose cycle in isolated islets during glucose-stimulated
insulin release
Am. J. Physiol. 219, 876-880

Soeldner J.S., Slone D. (1965):
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin
using the double antibody technique
Diabetes 14, 771

Spergel G., Bleicher S.J., Goldberg M., Adesman J.,
Goldner M.G. (1967):
The effect of potassium on the impaired glucose tolerance in
chronic uremia
Metabolism 16, 581-585

Spergel G., Schmidt P., Stern A., Bleicher S.J. (1967 b):
Effects of hypokalemia on carbohydrate and lipide metabolism in
the rat
Diabetes 16, 312-318

Strölin W. (1983):
Zur Bedeutung von Thiolen für die Aufnahme von Calcium in die Zellen Langerhansscher Inseln von Ratten
Dissertation Tübingen

Sugden M.D., Ashcroft J.H. (1978):
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets
Diabetologia 15, 173-180

Täljedahl I.B. (1981):
On insulin secretion
Diabetologia 21, 1

Ther L. (1965):
Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 46-55

Tomlinson S., Walker S.W., Brown B.L. (1982):
Calmodulin and insulin secretion
Diabetologia 22, 1-5

Trus M.D., Hintz C.S., Weinstein J.B., Williams A.D., Pagliari A.S., Matschinsky F.M. (1978):
Effects of glucose and acetylcholine on islet tissue NADH and insulin release
Life Sci. 22, 809-816

Umbreit W.W., Burris R.H., Stauffer J.P. (1972):
Manometric and biochemical techniques
5th edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis, USA, 146

Veech R.L., Eggleston L.V., Krebs H.A. (1969):
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasma of rat liver
Biochem. J. 115, 609-619

Verspohl E.J., Händel M., Ammon H.P.T. (1979):
Pentose phosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration
Endocrinology 105, 1269-1274

Wollheim C.B., Tsien R.Y., Pozzan T. (1983):
Stimulation of insulin release is accompanied by an increase in cytosolic free Ca^{2+}
Diabetologia 25, 205 (Abstr. 412)

Yagi K., Yazawa M., Kakiuchi S., Ohsima M., Uenishi K. (1978):
Identification of an activator protein for myosin light chain kinase as the Ca^{2+}-dependent modulator protein
J. Biol. Chem. 253, 1338-1341

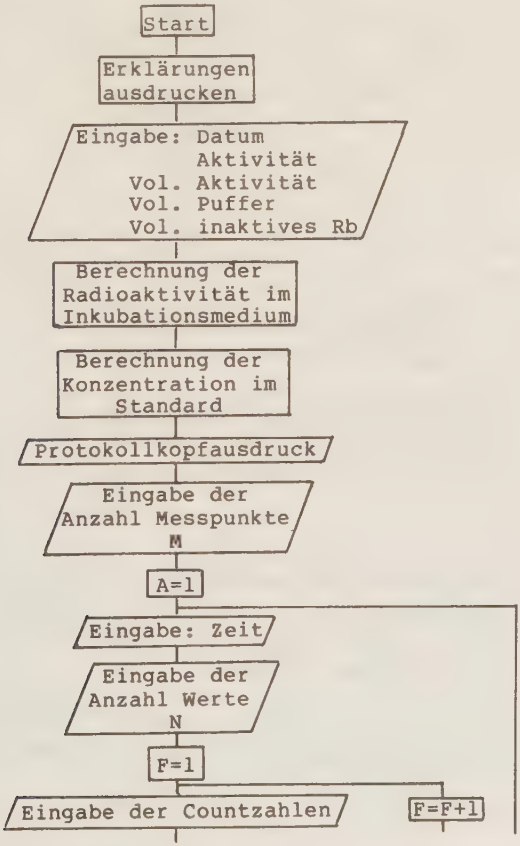
Zawalich W.S., Pagliari A.S., Matschinsky F.M. (1977):
Effects of iodoacetate, mannoheptulose and 3-O-methylglucose on secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets
Endocrinology 100, 1276-1283

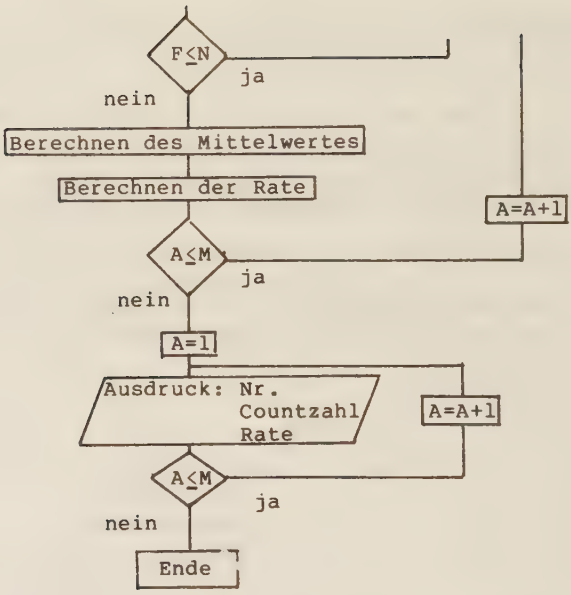
8 Anlage

8.1 Programm zur Berechnung der Rubidiumaufnahme

Mit dem hier beschriebenen Programm wurde aus den gemessenen Countzahlen und den Daten der zur Herstellung des Inkubationsmediums eingesetzten Radioaktivität der Gehalt der Inseln an ^{86}Rubidium berechnet und ein Protokoll ausgedruckt.

Programmablauf:






```
10  REM  *****************
20  REM
30  REM  PROGRAMM ZUR
40  REM  BERECHNUNG DES
50  REM  INSELGEHALTES
60  REM  M.WAHL
70  REM
80  REM  KONZ.BER.230
90  REM  DTO. AUSDRUCK 400
100  REM  WERTEBER. 610
110  REM  DTO.AUSDRUCK 710
120  REM
130  REM  *****************
140  HOME
150  PRINT "RECHENPROGRAMM FUER D
     IE BERECHNUNG DES RUBIDIUMGE
     HALTS DER INSEL"
160  PRINT "C M.WAHL 1982"
170  INPUT "DATUM      ";TG$
180  INPUT "RB GEHALT DER AKTIVIT
     AET IN UG/ML    ";X
190 A = X * 1E - 6
200  INPUT "VOL. DER EINGESETZTEN
      AKTIVITAET IN ML";B
210  INPUT "VOL. DER ZUGESETZTEN
     INAKTIVEN RB-LSG. 30 M-MOLAR
      IN ML     ";C
220  INPUT "VOL. DER INKUBATIONS-
     KRB IN ML    ";N
230 D = B + C + N
240 F = ((A * B) + (2.58E - 3 * C
     )) / D
250  PRINT "G RB / ML IN DER "
260  PRINT "INKUBATIONSLSG
      ",F
270 G = F / 100
280  PRINT "G RB IN 10 UL STANDAR
     D     ",G
290 H = G / 86
300  PRINT "KONZENTRATION IM"
310  PRINT "STANDARD    ";H;"    MO
     L/10UL"
320  INPUT "STANDARDCOUNTZAHL
      ";P
330  REM  KOPFAUSDRUCK
340  PRINT "SOLL ICH EIN PROTOKOL
     L"
350  PRINT "AUSDRUCKEN ?"
```

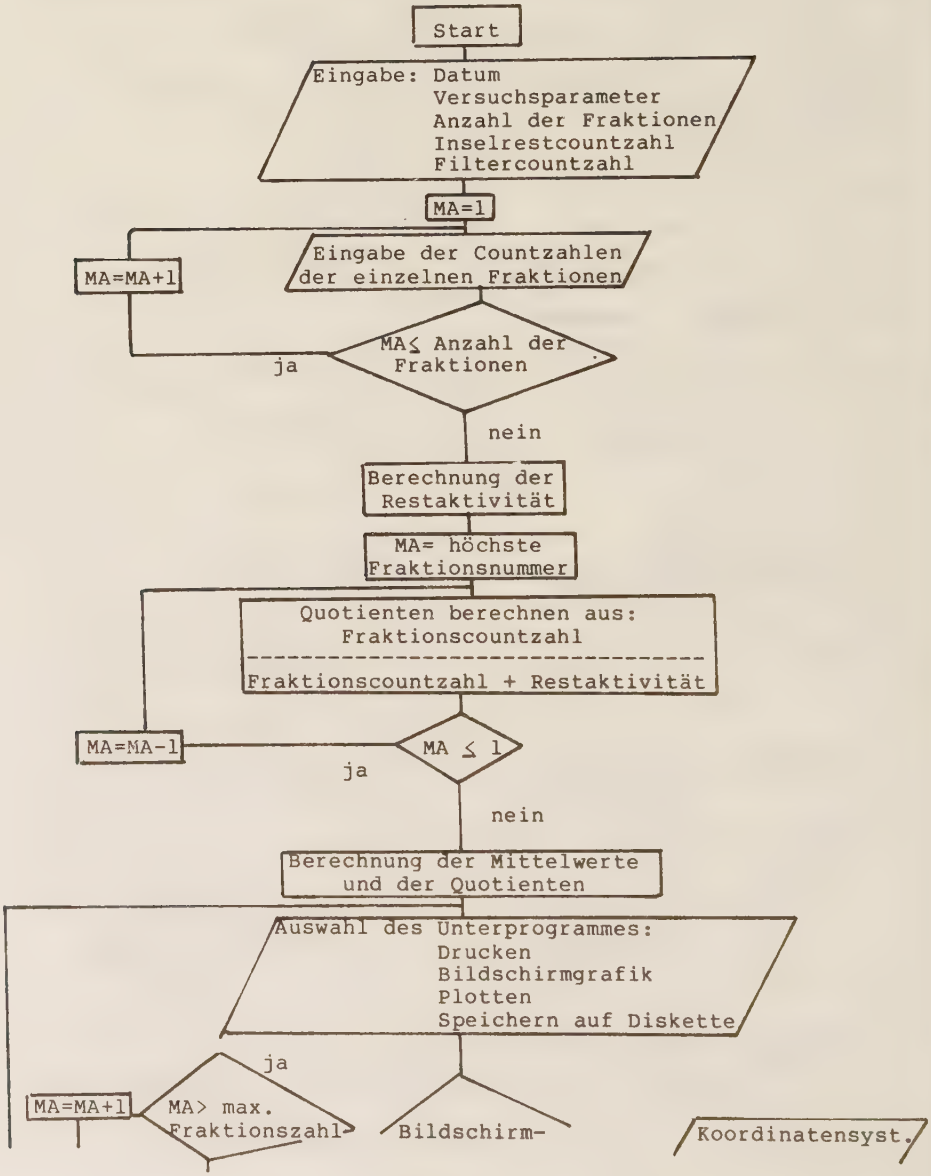
```
360  FLASH : PRINT "WENN JA BITTE
     TIPPE   1"
370  NORMAL : PRINT "SONST IRGEND
     EINE ANDERE ZAHL"
380  INPUT "SOLL ICH ?      ";FR
390  IF FR <  > 1 THEN  GOTO 610
400  PR£ 1
410  PRINT "DATUM"; TAB( 30)TG$
420  PRINT "RB GEHALT DER  "
430  PRINT "AKTIVITAET
        ";X;" UG/ML"
440  PRINT "VOL. DER ZUGESETZTEN"

450  PRINT "AKTIVITAET IN ML
                    ";B
460  PRINT "VOLUMEN DER INAKTIVEN
     "
470  PRINT "RB-LSG. 30 MMOLAR IN
     ML              ";C
480  PRINT "VOLUMEN KRB FUER DIE"

490  PRINT "INKUBATIONSLSG
                    ";N
500  PRINT "INKUBATIONSLSG    ";F;
     " G RB / ML"
510  PRINT "STANDARD          ";G;
     " G RB / 10 UL"
520  PRINT "STANDARDKONZ.     ";H;
     "  MOL / 10 UL"
530  PRINT "STANDARDCOUNTZAHL
        ";P
540  REM  PROTOKOLLTABELLE
550  PRINT "



          "
560  PRINT "    "
570  PRINT "WERTE AUFNAHMEINSEL
               WERTE EFFLUXINSE
     L          EFFLUXRATE"
580  PRINT "ZEIT   COUNT     INSEL
     GEHALT      COUNT        INSE
     LGEHALT     RATE"
590  PRINT "NR                IN PM
     OL/INSEL                  IN P
     MOL/INSEL"
600  PR£ 0
610  REM  MITTELWERTE
620  REM  WERTEINGABE
630  HOME
640  PRINT : INPUT "ANZAHL DER ZE
     ITWERTE    ";ZI
650  DIM ZE(ZI)
660  DIM W$(ZI,ZI)
670  DIM W(20)
680  FOR X = 1 TO ZI
690  PRINT : INPUT "ZEIT   ";ZE(X
     )
700  INPUT "ANZAHL DER WERTE
        ";NM
710  IF NM > 20 THEN  GOTO 700
720  MS = 0
730  FOR MM = 1 TO NM
740  PRINT "WERT NR   ";MM: INPUT
     "COUNTZAHL         ";W(MM)
750  REM  SUMMENBILDUNG
760  MS = MS + W(MM)
770  NEXT MM
780  REM  AUSDRUCK
790  REM  DRUCKDATEN
800  PR£ 1
810  PRINT  TAB( 2);ZE(X);
820  FOR MM = 1 TO NM
830  PRINT  TAB( 8)W(MM)
840  NEXT MM
850  MV = MS / NM
860  MW =  INT (MV + .5)
870  REM  INSELGEHALT
880  I = MW / P * H
890  W$(ZE,X) =  STR$ (I / 20E - 1
     2)
900  PRINT "MW"; TAB( 8)MW; TAB(
     17);W$(ZE,X)
910  PRINT ""
920  PR£ 0
930  END
```

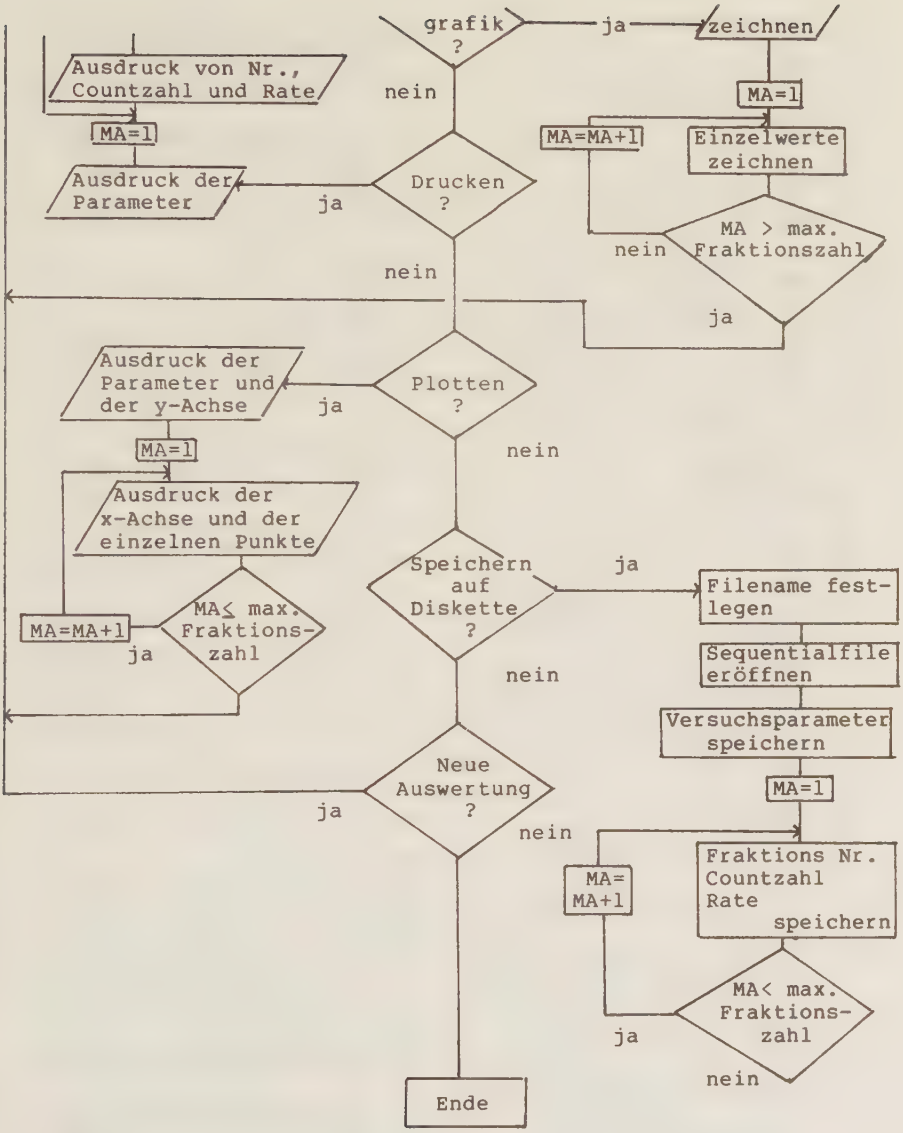
8.2 Programm zur Berechnung der Effluxrate bei Perifusionen

Mit diesem Programm wurde aus den gemessenen Countzahlen die Rubidiumeffluxrate pro Minute berechnet, ein Ergebnisprotokoll ausgedruckt, eine Kurve geplottet und die Daten zur weiteren

Verarbeitung auf Diskette gespeichert.

Programmablauf:




grafik ?
ja
zeichnen
nein
Ausdruck von Nr., Countzahl und Rate
MA=1
MA=1
MA=MA+1
Einzelwerte zeichnen
Drucken ?
ja
Ausdruck der Parameter
MA > max. Fraktionszahl
nein
ja
nein
Ausdruck der Parameter und der y-Achse
Plotten ?
ja
MA=1
nein
Ausdruck der x-Achse und der einzelnen Punkte
Speichern auf Diskette ?
ja
Filename festlegen
MA=MA+1
MA≤ max. Fraktions-zahl
ja
nein
Sequentialfile eröffnen
Versuchsparameter speichern
Neue Auswertung ?
MA=1
ja
nein
MA= MA+1
Fraktions Nr. Countzahl Rate speichern
MA< max. Fraktions-zahl
ja
nein
Ende

```
100  REM  *************
110  REM
120  REM  PROGRAMM ZUR
130  REM  BERECHNUNG DER
140  REM  EFFLUXRATE
150  REM  M.WAHL
160  REM
170  REM  EINGABEKOPF 400
180  REM  EING.WERTE 550
190  REM  RECHENTEIL 600
200  REM  DRUCKEN 980
210  REM  BILDSCHIRMGRAFIK 1290
220  REM  PLOTTEN 1510
230  REM  DISK-SPEICHERN 1810
240  REM
250  REM  **************
260  DIM CT(50)
270  DIM GB(159)
280  DIM EC(100)
290  DIM EA(50)
300  DIM GA(251)
310  DIM EB(50)
320  DIM YB(50)
330  DIM ED(50)
340  HOME
350 SA = 0
360  INVERSE : HTAB 10: PRINT "EF
     FLUXRATENBERECHNUNG"
370  NORMAL : PRINT
380  PRINT "DIESES PROGRAMM BEREC
     HNET DIE EFFLUXRATE VON RUBI
     DIUM BEI INSELN"
390  REM  EINGABE
400  REM  EINGABE
410  PRINT : PRINT
420  INPUT "DATUM:
      ";DA$
430  INPUT "NR. DES VERSUCHES:
      ";DB$
440  INPUT "WAS WIRD UNTERSUCHT?
      ";DC$
450  PRINT : PRINT : PRINT "EINGA
     BE DER DATEN:"
460  PRINT : PRINT "WIEVIELE FRAK
     TIONEN WURDEN"
470  INPUT "GESAMMELT ? (MAX. 50)
          ";NA
480  PRINT : PRINT "COUNTZAHL DER
      "
490  INPUT "INSELRESTPROBE:
         ";CI
500  PRINT : PRINT "COUNTZAHL DER
      "
510  INPUT "FILTERPROBE
         ";CF
520  PRINT : PRINT "EINGABE DER C
     OUNTZAHLEN DER EINZELNEN FRA
     KTIONEN, MIT DER ";
530  INVERSE : PRINT "ERSTEN";: NORMAL

540  PRINT " GESAMMELTEN FRAKTION
      BEGINNEN !"
550  FOR MA = 1 TO NA
560  PRINT : PRINT MA;". FRAKTION
     :      ";
570  INPUT "";CT(MA)
580  NEXT
590  REM  EINGABE BEENDET
600  REM  RECHENTEIL
610 CB = CI + CF: REM  RESTAKT.
620  PRINT : PRINT "FRAKTION" TAB(
     16)"COUNTZAHL" TAB( 33)"RATE
     "
630  FOR MA = NA TO 1 STEP  - 1
640 SA = SA + CT(MA)
650 EA(MA) = (CT(MA) / (CB + SA))
     * 100
660 EB(MA) = ( INT ((EA(MA) * 980
     ) + .5) / 10000) / 2
670  IF EB(MA) < 1 THEN YB(MA) =
     32
680  IF EB(MA) >  = 1 THEN YB(MA)
      = 31
690  IF EB(MA) >  = 10 THEN YB(MA
     ) = 30
700  NEXT MA
710 KA = 0:KB = 0:KC = 0:KE = 0:K
     F = 0
720 KA = (EB(8) + EB(9) + EB(10))
     / 3
730 KB = (EB(19) + EB(20) + EB(21
     )) / 3
740 KC = KA - KB
750  IF KA = 0 THEN  GOTO 780
760 KE = KC / KA
770 KF = KB / KA
780  FOR MA = 1 TO NA
790  PRINT  TAB( 3)MA; TAB( 16)CT
     (MA); TAB( YB(MA))EB(MA)
800  NEXT MA
810 SG = SA + CI + CF
820  PRINT "AUFNAHME  ";SG;" CPM"

830  REM  ERGEBNISAUSGABE
840  PRINT : PRINT "BITTE AUSWAEH
     LEN:  "
850  PRINT "PROTOKOLLAUSDRUCK:
               D"
860  PRINT "GRAFIK:
               G"
```

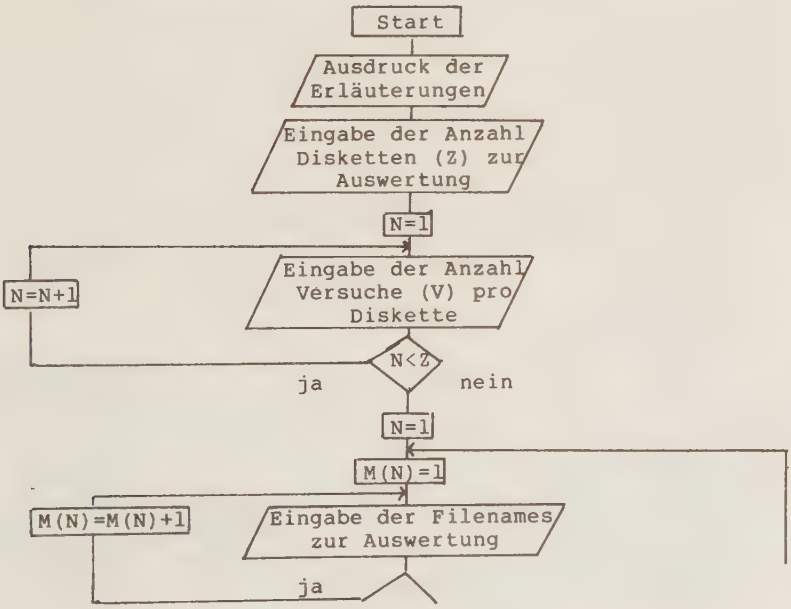
```
870  PRINT "PLOTTEN:
               P"
880  PRINT "DISKETTENSPEICHERUNG:
               S"
890  PRINT "NEUE AUSWERTUNG:
               N"
900  PRINT : INPUT "WAS DARF ES S
     EIN ?      ";GA$
910  IF GA$ = "G" THEN  GOSUB 129
     0
920  IF GA$ = "S" THEN  GOSUB 181
     0
930  IF GA$ = "P" THEN  GOSUB 151
     0
940  IF GA$ = "D" THEN  GOSUB 980

950  IF GA$ <  > "N" THEN  GOTO 8
     30
960  IF GA$ = "N" THEN  GOTO 340
970  END
980  REM  PROTOKOLLAUSDRUCK
990  HOME : VTAB 10:
1000  PRINT "IST PAPIER IM DRUCKE
     R ?"
1010  PRINT "IST DER DRUCKER AN ?
     "
1020  FLASH : PRINT "       ?????
          "
1030  NORMAL : INPUT "JA ODER NEI
     N ?      ";DD$
1040  IF DD$ <  > "JA" THEN  GOTO
     980
1050  PR£ 1: REM  DRUCKERADRESSE
1060  PRINT "DATUM:
               ";DA$
1070  PRINT "NR. DES VERSUCHES:
               ";DB$
1080  PRINT "INHALT:
                    ";DC$
1090  PRINT "ANZAHL DER FRAKTIONE
     N:          ";NA
1100  PRINT "INSELRESTPROBE:   (CP
     M)          ";CI
1110  PRINT "FILTER:           (CP
     M)          ";CF
1120  PRINT "RESTAKTIVITAET:   (CP
     M)          ";CB
1130  PRINT : PRINT : PRINT : PRINT

1140  PRINT "FRAKTION" TAB( 16)"C
     OUNTZAHL" TAB( 33)"RATE"
1150  PRINT
1160  FOR MA = 1 TO NA
1170  PRINT  TAB( 3)MA; TAB( 16)C
     T(MA); TAB( YB(MA))EB(MA)
1180  NEXT MA
1190  PRINT : PRINT "AUFNAHME:
     ";SG;" CPM"
1200  PRINT : PRINT "MITTELWERT F
     R. 8;9;10 :"KA
1210  PRINT "MITTELWERT FR.19;20;
     21 :"KB
1220  PRINT "DIFFERENZ :";KC
1230  PRINT "DIFFERENZENQUOTIENT
     : ";KE
1240  PRINT "QUOTIENT : ";KF
1250  PR£ 0
1260  RETURN
1270  END
1280  REM  GRAFIKBERECHNUNG
1290  FOR MA = 1 TO NA
1300  RETURN : REM ----------
     ----------
1310 GA(MA) = MA * 5
1320 EC(MA) =  INT ((EB(MA) * 120
     ) + .5)
1330 GB(MA) = 159 - EC(MA)
1340  IF GB(MA) <  = 0 THEN GB(MA
     ) = 1
1350  PRINT MA;GB(MA)
1360  NEXT MA
1370  REM  GRAFIK
1380  HOME : HGR
1390  HCOLOR= 3
1400  HPLOT 0,0 TO 0,159 TO 279,1
     59
1410  FOR MA = 1 TO NA
1420  HPLOT GA(MA),158
1430  HPLOT GA(MA),GB(MA)
1440  NEXT MA
1450  VTAB 21
1460  INPUT "WEITER MACHEN ?  (J)
       ";GX$
1470  IF GX$ <  > "J" THEN  GOTO
     1460
1480  TEXT
1490  RETURN
1500  END
1510  REM  PLOT
1520  PRINT "IST DER DRUCKER AN U
     ND PAPIER EINGELEGT ? (J/N)
      ": INPUT X$
1530  PR£ 1
1540  PRINT "NUMMER DES VERSUCHES
     :  ";DB$
1550  PRINT "SUBSTANZ:
       ";DC$: PRINT : PRINT
1560  PRINT  CHR$ (27); CHR$ (69)
     ;(0)(5)
1570  PRINT  CHR$ (27); CHR$ (76)
     ;(0)(5)
```

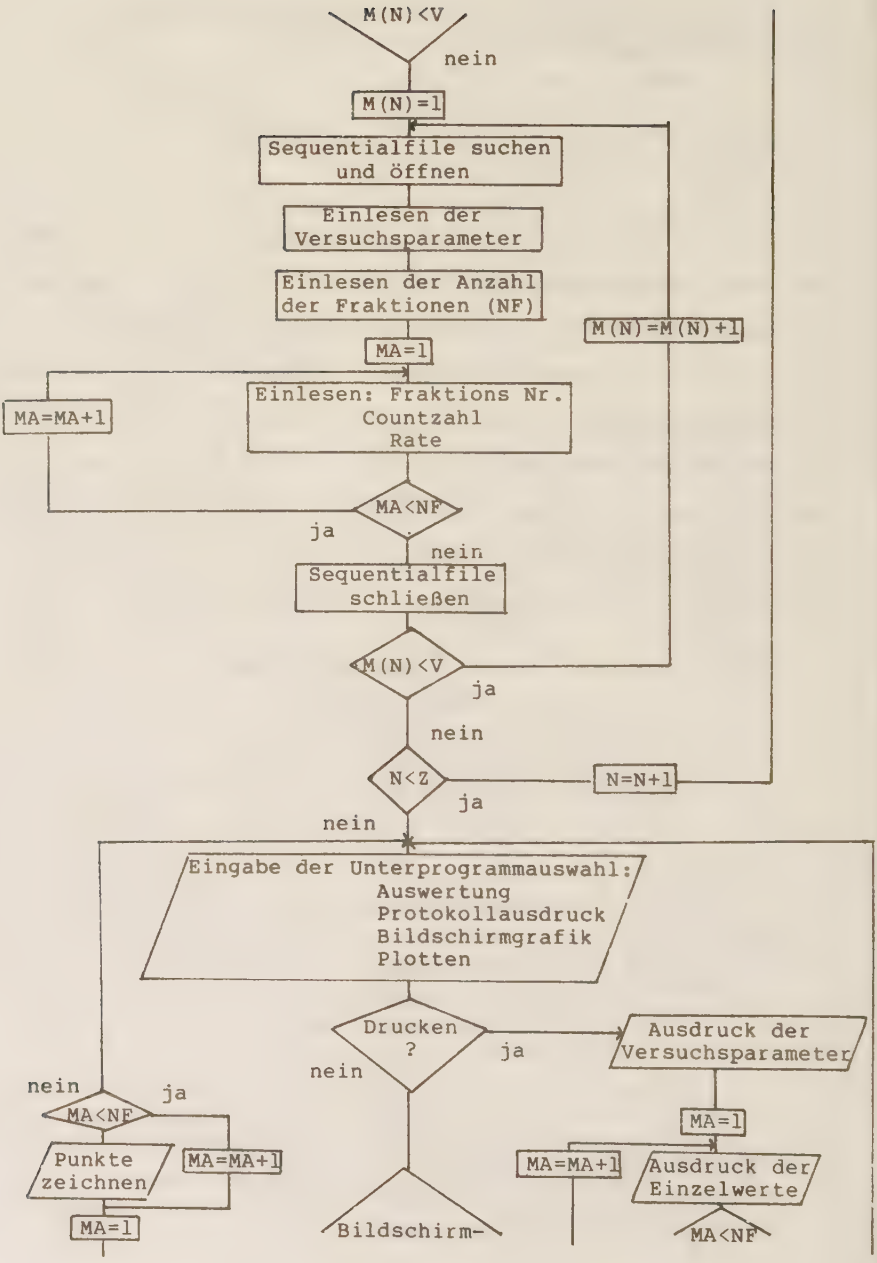
```
1580  PRINT  TAB( 5)"0"; SPC( 35)
     "1"; SPC( 35)"2"; SPC( 35)"3
     "; SPC( 35)"4"
1590  FOR X = 1 TO 150: PRINT "-"
     ;: NEXT X: PRINT
1600  FOR MA = 1 TO 36:ED(MA) =  INT
     ((EB(MA) * 35) + .5): NEXT M
     A
1610  FOR MA = 1 TO 9
1620  IF ED(MA) > 95 THEN ED(MA) =
     95
1630  PRINT  TAB( 4)"I"; SPC( ED(
     MA))"."
1640  NEXT MA
1650 MA = 10:TT = ED(MA) - 2
1660  IF TT < 0 THEN TT = 0
1670  PRINT MA; TAB( 4)"I"; SPC(
     TT)"—.—"
1680  FOR MA = 11 TO 25
1690  PRINT  TAB( 4)"I"; SPC( ED(
     MA))"."
1700  NEXT MA
1710 MA = 25:TT = ED(MA) - 2
1720  IF TT < 0 THEN TT = 0
1730  PRINT MA; TAB( 4)"I"; SPC(
     TT)"—.—"
1740  FOR MA = 26 TO 36
1750  PRINT  TAB( 4)"I"; SPC( ED(
     MA))"."
1760  NEXT MA
1770  PRINT  CHR$ (27); CHR$ (26)
     ; CHR$ (73)
1780  PRE 0
1790  RETURN
1800  END
1810  REM  DISKETTENSPEICHERUNG
1820  HOME
1830  PRINT "DIESER PROGRAMMTEIL
     KANN DAS"
1840  PRINT "ERGEBNIS AUF EINER D
     ISKETTE SPEICHERN"
1850  PRINT : PRINT "SOLL DAS ERG
     EBNIS AUF DISKETTE"
1860  PRINT "GESPEICHERT WERDEN ?
     "
1870  PRINT : INPUT "    J/N ?  "
     ;SA$
1880  IF SA$ <  > "J" THEN  RETURN

1890  PRINT "  "
1900  REM  FILENAMEFESTLEGUNG
1910  PRINT "DER FILENAME IST :"D
     C$;DB$
1920  PRINT : INVERSE : INPUT "EI
     NVERSTANDEN ?   J/N ?    ";S
     B$: NORMAL
1930 TT$ = "ERGEBNISSE "
1940 SC$ = DC$ + DB$
1950  IF SB$ = "J" THEN  GOTO 201
     0
1960  REM  ANDERER FILENAME
1970  PRINT : PRINT "WIE SOLL DER
     FILENAME DANN SEIN ?"
1980  PRINT : INVERSE : PRINT "VO
     RSICHT: ER MUSS EINDEUTIG SE
     IN": PRINT "          ER MUS
     S UNVERWECHSELBAR SEIN": NORMAL

1990  PRINT ""
2000  INPUT "NEUER FILENAME :";SC
     $
2010  PRINT : PRINT "DER FILENAME
     IST ALSO:"
2020  PRINT : PRINT "          "
     ;
2030  INVERSE : PRINT SC$: NORMAL

2040  REM  SEQUENTIALFILE SCHREIB
     EN
2050  REM  EINLEGEN
2060  PRINT : PRINT "DATENDISKETT
     E EINLEGEN !"
2070  PRINT : PRINT "DATENDISKETT
     E EINGELEGT ?"
2080  INPUT "        J/N  ???
         ";SE$
2090  IF SE$ <  > "J" THEN  GOTO
     1810
2100  REM  SCHREIBEN
2110 D$ =  CHR$ (4): REM  CTRL D
2120  PRINT D$;"OPEN"SC$
2130  PRINT D$;"DELETE"SC$
2140  PRINT D$;"OPEN"SC$
2150  PRINT D$;"WRITE"SC$
2160  PRINT DA$: REM  DATUM
2170  PRINT NA: REM  ANZAHL FRAKT
     IONEN
2180  PRINT CI: REM  INSELREST
2190  PRINT CF: REM  FILTER
2200  PRINT CB: REM  SUMME
2210  PRINT SG: REM  AUFNAHME
2220  REM  LEER
2230  FOR MA = 1 TO NA
2240  PRINT MA: REM  NR DER FRAKT
     ION
2250  PRINT CT(MA): REM  COUNTZAH
     L
2260  PRINT EB(MA): REM  RATE
2270  NEXT
2280  PRINT KA: REM  MW 8;9;10
2290  PRINT KB: REM  MW 19;20;21
2300  PRINT KC: REM  DIFF.
```

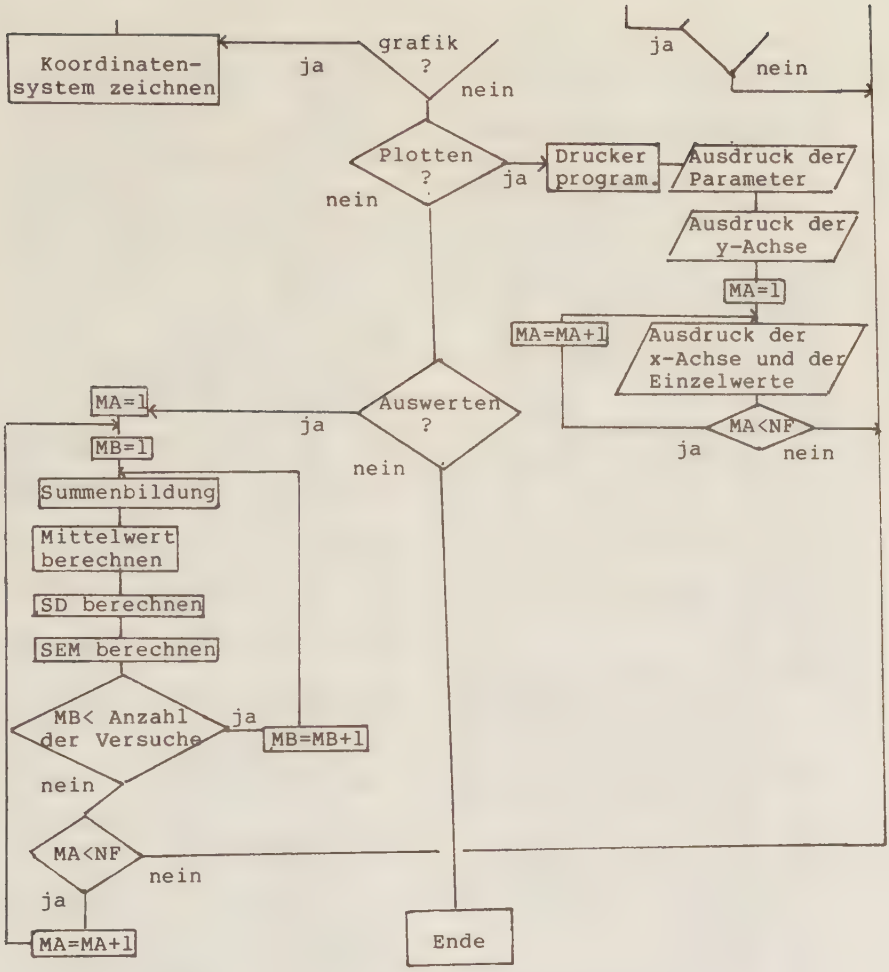
```
2310  PRINT KE: REM  DIFF.QUOT.        2340  PRINT D$;"CLOSE"SC$
2320  PRINT KF: REM  QUOTIENT          2350  RETURN
2330  PRINT "ENDE"
```

8.3 Programm zur Auswertung der Perifusionen

Dieses Programm liest die Ergebnisse von frei wählbaren Versuchen von der Diskette und berechnet die Mittelwerte, Standardabweichungen und die SEM für alle Fraktionen sowie die vom unter 8.2 beschriebenen Programm berechneten Mittelwerte und Quotienten. Danach wird ein Protokoll ausgedruckt und das Ergebnis in einem Schaubild auf dem Bildschirm oder mit dem Plotter dargestellt. Das Programm ist zum Wiederabrufen und Ausdrucken von einzelnen, gespeicherten Versuchsergebnissen ebenfalls verwendbar.
Das Auswertungsprogramm läuft folgendermaßen ab:




M(N)<V
nein
M(N)=1
Sequentialfile suchen und öffnen
Einlesen der Versuchsparameter
Einlesen der Anzahl der Fraktionen (NF)
M(N)=M(N)+1
MA=1
MA=MA+1
Einlesen: Fraktions Nr.
Countzahl
Rate
MA<NF
ja
nein
Sequentialfile schließen
M(N)<V
ja
nein
N<Z
N=N+1
ja
nein
Eingabe der Unterprogrammauswahl:
Auswertung
Protokollausdruck
Bildschirmgrafik
Plotten
Drucken ?
ja
Ausdruck der Versuchsparameter
nein
nein
ja
MA<NF
MA=1
Punkte zeichnen
MA=MA+1
MA=MA+1
Ausdruck der Einzelwerte
MA=1
Bildschirm-
MA<NF


Koordinaten-
system zeichnen
ja
grafik
?
nein
ja
nein
Plotten
?
ja
nein
Drucker
program.
Ausdruck der
Parameter
Ausdruck der
y-Achse
MA=1
MA=MA+1
Ausdruck der
x-Achse und der
Einzelwerte
MA<NF
ja
nein
Auswerten
?
ja
nein
MA=1
MB=1
Summenbildung
Mittelwert
berechnen
SD berechnen
SEM berechnen
MB< Anzahl
der Versuche
ja
MB=MB+1
nein
MA<NF
nein
ja
MA=MA+1
Ende

```
100  REM  ************************

110  REM
120  REM  PROGRAMM ZUR AUSWERTUNG

130  REM  VON GESPEICHERTEN VERSU
     CHEN
140  REM  TEIL1 EINLESEN VON DISK

150  REM  TEIL2 BERECHNEN VON
160  REM            MITTELWERT
170  REM            SD
180  REM            SEM
190  REM  TEIL3 ERGEBNISAUSGABE
200  REM  M.WAHL
210  REM
220  REM  FILEEINGABE 300
230  REM  F.LESEN 560
240  REM  DRUCKEN
250  REM  PLOTTEN 1310
260  REM  AUSWERTEN 1700
270  REM  AUSW.DRUCKEN 2000
280  REM
290  REM  **********************
300  REM  FILEEINGABE
310  HOME
320  CLEAR
330  PRINT : PRINT "DIESES PROGRA
     MM WERTET DIE AUF EINER DISK
     ETTE GESPEICHERTEN ERGEBNISS
     E AUS"
340  PRINT : PRINT
350  PRINT "WIEVIELE DISKETTEN WE
     RDEN AUSGEWERTET ? ";: INPUT
     FX
360  PRINT : FOR NX = 1 TO FX
370  PRINT "ANZAHL DER VERSUCHE A
     UF DISKETTE ";NX;" ? ";: INPUT
     " ";FA(NX)
380  NEXT NX
390  PRINT : PRINT
400  DIM ED(50)
410  DIM GA(251): DIM GB(159)
420  DIM MB(50,50)
430  DIM SC$(20): DIM ZI(20): DIM
     TG$(20)
440  DIM CT(50,10)
450  DIM EB(50,10): DIM EB$(50,10
     )
460  DIM EA(50,10): DIM EC(50,10)

470  FOR NX = 1 TO FX:LB = LA + 1
     :LA = LA + FA(NX)
480  PRINT "EINGABE DER FILENAMES
      AUF DISKETTE ";NX;" :"
490  PRINT : FOR NA = LB TO LA
500  INPUT "   FILENAME :   ";SC$
     (NA)
510  NEXT NA
520  INVERSE : PRINT "SPEICHERDIS
     KETTE ";NX;" EINLEGEN !!!!":
      NORMAL
530  FOR L = 1 TO 1000: NEXT : INPUT
     "FERTIG ? J/N  ";DE$
540  IF DE$ <  > "J" THEN  GOTO 5
     20
550  FOR NA = LB TO LA
560  REM  FILE LESEN
570 D$ =  CHR$ (4): REM  CTRL D
580  PRINT D$;"OPEN"SC$(NA)
590  PRINT D$;"READ"SC$(NA)
600  INPUT TG$(NA)
610  INPUT NB(NA): REM  ANZAHL FR
     AKTIONEN
620  INPUT CI(NA): REM  INSELREST

630  INPUT CF(NA): REM  FILTER
640  INPUT CB(NA): REM  SUMME
650  INPUT CX(NA): REM  AUFNAHME
660  FOR MA = 1 TO NB(NA)
670  INPUT MB(NA,MA)
680  INPUT CT(MA,NA): REM  COUNTZ
     AHL
690  INPUT EB(MA,NA): REM  RATE
700  NEXT MA
710  INPUT EB(36,NA): REM  MW8;9;
     10
720  INPUT EB(37,NA): REM  MW19;2
     0;21
730  INPUT EB(38,NA): REM  DIFF.
740  INPUT EB(39,NA): REM  DIFF.Q
     UOT.
750  INPUT EB(40,NA): REM  QUOTIE
     NT
760  INPUT X$
770  PRINT D$;"CLOSE"SC$(NA)
780  IF X$ <  > "ENDE" THEN  GOTO
     100
790  PRINT : PRINT "EINLESEN DES
     ";NA;"-TEN VERSUCHES BEENDET
     . "
800  NEXT NA
810  PRINT : PRINT
820  NEXT NX
830  REM
840  REM  ERGEBNISAUSGABE
850  PRINT : PRINT : PRINT
860  PRINT : PRINT "BITTE AUSWAEH
     LEN:"
```

```
870  PRINT : PRINT "AUSDRUCKEN:
                  D"
880  PRINT "AUSWERTEN:
          W"
890  PRINT "PLOTTEN:
                    P"
900  REM
910  INPUT "WAS DARF ES SEIN ?
     ";GA$
920  IF GA$ = "D" THEN  GOSUB 980

930  IF GA$ = "W" THEN  GOSUB 170
     0
940  REM
950  IF GA$ = "P" THEN  GOSUB 131
     0
960  GOTO 840
970  END
980  REM  AUSDRUCK
990  HOME : VTAB 10:
1000  PRINT "IST DER DRUCKER AN U
     ND PAPIER EINGELEGT? "
1010  FLASH : PRINT "        ???
           ": NORMAL
1020  INPUT "JA ODER NEIN ?   ";D
     D$
1030  IF DD$ <  > "JA" THEN  GOTO
     1000
1040  FOR NA = 1 TO FA
1050  PR£ 1: REM  DRUCKERADRESSE
1060  PRINT "DATUM:
                ";TG$(NA)
1070  PRINT "NR. DES VERSUCHES:
                ";DB$(NA)
1080  PRINT "INHALT:
                ";DC$
1090  PRINT : PRINT "ANZAHL DER F
     RAKTIONEN:                ";NB
     (NA)
1100  PRINT "INSELRESTPROBE:
                          ";CI(NA)
1110  PRINT "FILTER:
                          ";CF(NA)
1120  PRINT "RESTAKTIVITAET:
                          ";CB(NA)
1130  PRINT : PRINT : PRINT : PRINT

1140  PRINT "FRAKTION" TAB( 16)"C
     OUNTZAHL" TAB( 33)"RATE"
1150  PRINT
1160  REM  REM REM REM
1170  REM  TABULATOR
1180  FOR MA = 1 TO NB(NA)
1190  IF EB(MA,NA) < 1 THEN YB(MA
     ) = 31
1200  IF EB(MA,NA) > 1 THEN YB(MA
     ) = 30
1210  IF EB(MA,NA) > 10 THEN YB(M
     A) = 29
1220  PRINT  TAB( 3)MB(NA,MA); TAB(
     16)CT(MA,NA); TAB( YB(MA))EB
     (MA,NA)
1230  NEXT MA
1240  PR£ 0
1250  FLASH : PRINT "WEITER DRUCK
     EN?": PRINT "PAPIER EINLEGEN
     !"
1260  NORMAL : INPUT "J/N ?  ";SE
     $
1270  IF SE$ <  > "J" THEN  RETURN

1280  NEXT NA
1290  RETURN
1300  END
1310  REM  PLOT
1320  PRINT "IST PAPIER IM DRUCKE
     R ? (J/N) "
1330  INPUT X$
1340  IF X$ <  > "J" THEN  RETURN

1350  PR£ 1
1360  PRINT "AUSGEWERTETE VERSUCH
     E :  "
1370  FOR NA = 1 TO LA
1380  PRINT SC$(NA),: NEXT
1390  REM  DRUCKERPROGRAMMIERUNG
1400  PRINT  CHR$ (27); CHR$ (69)
     ;(0)(5)
1410  PRINT  CHR$ (27); CHR$ (76)
     ;(0)(5)
1420  REM  KOORDINATENSYSTEM
1430  PRINT  TAB( 5)"."; SPC( 35)
     "."; SPC( 35)"."; SPC( 35)".
     "
1440  FOR X = 1 TO 120: PRINT "-"
     ;: NEXT : PRINT
1450  REM  BERECHNUNG
1460  FOR MA = 1 TO 35:ED(MA) =  INT
     ((SB(MA) * 35) + .5)
1470  IF ED(MA) > 149 THEN ED(MA)
      = 149
1480  NEXT MA
1490  REM  WERTEDRUCK
1500  FOR MA = 1 TO 9
1510  PRINT  TAB( 4)"!"; SPC( ED(
     MA))"."
```

```
1520  NEXT MA
1530 MA = 10: PRINT  TAB( 2)"."; TAB(
     4)"!"; SPC( ED(MA))"."
1540 MA = 11:TT = ED(MA) - 2
1550  IF TT < 0 THEN TT = 0
1560  PRINT  TAB( 4)"!"; SPC( TT)
     "-.-"
1570  FOR MA = 12 TO 24
1580  PRINT  TAB( 4)"!"; SPC( ED(
     MA))"."
1590  NEXT MA
1600 MA = 25: PRINT " ."; TAB( 4)
     "!"; SPC( ED(MA))"."
1610 MA = 26:TT = ED(MA) - 2
1620  PRINT  TAB( 4)"!"; SPC( TT)
     "-.-"
1630  FOR MA = 27 TO 35
1640  PRINT  TAB( 4)"!"; SPC( ED(
     MA))"."
1650  NEXT MA
1660  PRINT  CHR$ (27); CHR$ (26)
     ; CHR$ (73)
1670  PRE 0
1680  RETURN
1690  END
1700  REM  AUSWERTUNG
1710  DIM SB(50)
1720  DIM SC(50): DIM SD(50): DIM
     SE(50)
1730  DIM SF(50): DIM SG(50): DIM
     SH(50)
1740  PRE 1
1750  PRINT "AUSGEWERTETE VERSUCH
     E:"
1760  FOR NA = 1 TO LA: PRINT SC$
     (NA),
1770  NEXT NA: PRINT : PRINT
1780  PRINT "FRAKTION"; TAB( 10)"
     RATE"; TAB( 25)"SD"; TAB( 40
     )"SEM"
1790  PRE 0: PRINT
1800  HOME : PRINT : PRINT : PRINT
     : PRINT "RECHNEN IST EINE SC
     HWIERIGE ANGELEGENHEIT UND B
     RAUCHT EIWAS ZEIT."
1810  PRINT : PRINT "BITTE WARTEN
      SIE !    VIELEN DANK FUER I
     HR VERSTAENDNIS !"
1820  FOR MA = 1 TO 40
1830 SA = 0:DA = 0
1840 SC(MA) = 0
1850  FOR NA = 1 TO LA
1860 SA = SA + EB(MA,NA):DA = DA +
     1
1870  NEXT NA
1880 SB(MA) = SA / DA
1890 SF(MA) = ( INT ((SB(MA) * 98
     0) + .5)) / 10000
1900  REM  SD
1910  FOR NA = 1 TO LA
1920 SC(MA) = SC(MA) + ((EB(MA,NA
     ) - SB(MA)) ^ 2)
1930  NEXT NA
1940 SD(MA) =  SQR (SC(MA) / (DA -
     1))
1950 SG(MA) = ( INT ((SD(MA) * 98
     0) + .5)) / 10000
1960  REM  SEM
1970 SE(MA) = SD(MA) / ( SQR (DA)
     )
1980 SH(MA) = ( INT ((SE(MA) * 98
     0) + .5)) / 10000
1990  NEXT MA
2000  PRE 1
2010  FOR MA = 1 TO 35
2020  PRINT MA; TAB( 10)SF(MA); TAB(
     25)SG(MA); TAB( 40)SH(MA)
2030  NEXT MA
2040  PRINT
2050  PRINT "MITTELWERT DER FRAKT
     IONEN 8;9;10 :"
2060  PRINT  TAB( 10)SF(36); TAB(
     25)SG(36); TAB( 40)SH(36)
2070  PRINT "MITTELWERT DER FRAKT
     IONEN 19;20;21 :"
2080  PRINT  TAB( 10)SF(37); TAB(
     25)SG(37); TAB( 40)SH(37)
2090  PRINT "MITTELWERT DER DIFFE
     RENZEN :"
2100  PRINT  TAB( 10)SF(38); TAB(
     25)SG(38); TAB( 40)SH(38)
2110  PRINT "MITTELWERT DER DIFFE
     RENZQUOTIENTEN :"
2120  PRINT  TAB( 10)SF(39); TAB(
     25)SG(39); TAB( 40)SH(39)
2130  PRINT "MITTELWERT DER QUOTI
     ENTEN :"
2140  PRINT  TAB( 10)SF(40); TAB(
     25)SG(40); TAB( 40)SH(40)
2150  PRE 0
2160  GOSUB 1310
2170  RETURN
2180  END
```

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren

H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J.E. Schultz (Pharmazeutische Chemie)

E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie)

E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie)

E. Lindner, E. Bayer, M. Hanack (Chemie)

K. Botzenhart (med. Mikrobiologie)

H. Seiler (Physik)

M. Siess (Pharmakologie)

Lebenslauf

Martin Anton Wahl

geboren am 12. Januar 1956 in Stuttgart

Vater: Josef Wahl, Diplom-Ingenieur
Mutter: Ruth Wahl, geb. Schuster

verheiratet mit Barbara Wahl, geb. Hiller, Apothekerin
seit 26. Mai 1983

April 1963- November 1966	Besuch der Grundschule Stuttgart-Kaltental
Dezember 1966- Juni 1975	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Schickhardt-Gymnasiums in Stuttgart
Mai 1975	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Juli 1975- September 1976	Grundwehrdienst in Wiesbaden-Schierstein
Oktober 1976	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Tübingen
September 1978	Bestehen des ersten Abschnittes der Pharmazeutischen Prüfung in Tübingen
März 1980	Bestehen des zweiten Abschnittes der Pharmazeutischen Prüfung in Tübingen
April 1980- März 1981	Pharmaziepraktikum in der Mayerschen Apotheke in Tübingen, unter der Leitung von Herrn Apotheker Udo Kauer
April 1981	Bestehen der Pharmazeutischen Prüfung in Stuttgart und Erteilung der Approbation als Apotheker
Mai 1981	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen, Lehrstuhl Pharmakologie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
Mai 1981- Juli 1983	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Pharmakologie
ab August 1983	Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl Pharmakologie
Oktober 1983	Abschluß der Arbeiten an der hier vorliegenden Dissertation